



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE

(Direttore: Prof. Eusebio Tolu)

**INDIRIZZO IN FISIOLOGIA, FARMACOLOGIA, MORFOLOGIA E
FISIOPATOLOGIA DEL SISTEMA NERVOSO**

(Responsabile: Prof. Vittorio Anania)

**DIFFERENZIAZIONE DI ASTROCITI DA CELLULE STAMINALI
EMBRIONALI E LORO USO COME VETTORI DI TRANSGENI
NELLA TERAPIA SPERIMENTALE DEI GLIOMI CEREBRALI**

Tutor:

Chiar.mo Prof. Andrea Montella

Dottorando:

Dott. Andrea Carai

Anno Accademico 2009-2010

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 6
Epidemiologia	pag. 6
Scenario clinico	pag. 9
Caratteristiche genetiche	pag. 13
Sottotipi di GBM	pag. 14
Alterazioni delle vie di segnale cellulare	pag. 19
Terapia genica	pag. 28
<i>Vettori di terapia genica</i>	pag. 29
Vettori virali	pag. 30
Mezzi chimico-fisici	pag. 37
Vettori cellulari	pag. 37
<i>Geni terapeutici</i>	pag. 44
<i>Melanoma differentiation associated gene – 7 (MDA-7/IL-24)</i>	pag. 47
Scopo del lavoro	pag. 57
MATERIALI E METODI	pag. 59
Esperimenti in vitro	pag. 59
<i>Allestimento e caratterizzazione di cellule staminali embrionali murine esprimenti il transgene tet-inducibile MDA-7/IL-24</i>	pag. 59
<i>Coltura delle cellule staminali embrionali murine e loro differenziazione in astrociti</i>	pag. 61
<i>Caratterizzazione degli astrociti ottenuti da mESC transgeniche</i>	pag. 66
<i>Induzione dell'espressione genica attraverso la somministrazione di doxiciclina in astrociti transgenici MDA-7/IL-24</i>	pag. 70
<i>Analisi dell'espressione genica indotta da doxiciclina in astrociti transgenici MDA-7/IL-24</i>	pag. 71
<i>Analisi della migrazione degli astrociti transgenici MDA-7/IL-24</i>	pag. 78
<i>Induzione dell'apoptosi di cellule di glioma ad alto grado U87</i>	pag. 82

<i>Valutazione dell'apoptosi di cellule di glioma ad alto grado U87</i>	pag. 85
Esperimenti in vivo	pag. 92
<i>Xenotrapianto ortotopico di cellule di glioma ad alto grado U87</i>	pag. 92
<i>Impianto di astrociti transgenici MDA-7/IL-24</i>	pag. 94
<i>Induzione dell'espressione del transgene MDA-7/IL-24 in vivo</i>	pag. 94
<i>Valutazione dei volumi tumorali</i>	pag. 94
RISULTATI	pag. 98
Esperimenti in vitro	pag. 98
<i>Coltura delle cellule staminali embrionali murine e loro differenziazione in astrociti</i>	pag. 98
<i>Caratterizzazione degli astrociti ottenuti da mESC transgeniche ..</i>	pag. 105
<i>Analisi dell'espressione genica indotta da doxyciclina in astrociti transgenici MDA-7/IL-24</i>	pag. 108
<i>Analisi della migrazione degli astrociti transgenici MDA-7/IL-24 ..</i>	pag. 111
<i>Valutazione dell'apoptosi di cellule di glioma ad alto grado U87 ..</i>	pag. 113
Esperimenti in vivo	pag. 116
DISCUSSIONE	pag. 120
CONCLUSIONI	pag. 133
BIBLIOGRAFIA	pag. 134
RINGRAZIAMENTI	pag. 150

Il presente lavoro è stato parzialmente finanziato dal National Institute of Health e dal National Cancer Institute degli Stati Uniti d'America:
(NIH/NCI R01 CA129489-01A1. Grant to IM Germano, MD principal investigator).

INTRODUZIONE

I gliomi sono lesioni neoplastiche delle cellule gliali e costituiscono il 32% di tutti i tumori cerebrali primitivi. Tra essi, il glioblastoma multiforme (GBM, grado IV nella classificazione OMS) é il più frequente (17%) ed aggressivo (Louis, Ohgaki et al. 2007). I pazienti affetti da tale patologia hanno un'aspettativa di vita di circa 14 mesi, nonostante le terapie a disposizione (Ohgaki and Kleihues 2005; Ohgaki and Kleihues 2005; CBTRUS 2010).

Epidemiologia

Dal punto di vista epidemiologico i dati disponibili provengono da registri oncologici basati sulla classificazione patologica ICD-O (International Classification of Diseases for Oncology) e pertanto risentono delle caratteristiche della classificazione medesima (Fritz, Percy et al. 2000). Sebbene tale classificazione sia stata recentemente sottoposta ad aggiornamento, tuttavia le informazioni relative alle forme di glioma maligno possono essere ritenute relativamente affidabili, va comunque considerato il ruolo di fattori confondenti quali la mancata diagnosi istologica, specialmente in pazienti di età avanzata.

Si calcola che l'incidenza nei Paesi occidentali sia di circa 4/100.000 all'anno nei maschi e di 3,5/100.000 all'anno nelle femmine (CBTRUS 2010). Esiste una variabilità dell'incidenza in base all'area geografica e dell'etnia con minore incidenza nei Paesi in via di sviluppo e nelle popolazioni africana ed asiatica, sebbene sia possibile che tale variabilità sia da ascrivere a motivi socio-economici piuttosto che ad una reale predisposizione genetica da parte dei soggetti caucasici (Preston-Martin, Mack et al. 1989). L'incidenza di gliomi maligni non pare essersi modificata nel corso degli anni ed il suo aumento, osservato nel corso degli anni '80, pare essere piuttosto legato alla disponibilità di metodiche di imaging quali TC ed RMN che hanno enormemente facilitato il processo diagnostico (Legler, Ries et al. 1999).

Grande attenzione è stata rivolta negli anni alla valutazione di possibili fattori ambientali ed occupazionali che fossero correlati all'insorgenza di gliomi maligni. Nella maggior parte dei casi i dati a disposizione sono di difficile e non univoca interpretazione per l'esposizione contemporanea a numerosi cancerogeni (Zheng, Cantor et al. 2001; De Roos, Stewart et al. 2003; Pan, Ugnat et al. 2005). Tra le professioni in cui si osserva un aumento del rischio di insorgenza di glioma maligno vanno ricordate il medico – anatomista ed anatomopatologo in particolare – (Moss 1985; Hall, Harrington et al. 1991), il vigile del fuoco, l'agricoltore, l'elettricista, il lavoratore edile; sono anche coinvolti i lavoratori esposti ai prodotti plastici e della gomma, al cloruro di vinile, arsenico, mercurio, piombo e derivati del petrolio. L'esposizione agli idrocarburi aromatici policiclici e l'occupazione di autista o meccanico sono state correlate sia ad un aumento di rischio individuale che ad un aumento del rischio nella progenie dei soggetti esposti (Peters, Preston-Martin et al. 1981; Cordier, Lefeuvre et al. 1997). Sulla base della classificazione IARC (International Agency for Research on Cancer) sono considerati possibili cancerogeni per il sistema nervoso centrale dell'uomo: berillio, epicloroidrina, eptacoloro, tiouracile, metiltiouracile, propiltiouracile, piombo, solfato di diisopropile e diclorometano (IARC 2010). Tra le sostanze assunte con la dieta che sono state correlate con l'insorgenza di glioma maligno vanno segnalate: le nitrosuree, un elevato contenuto proteico dei cibi consumati, le carni insaccate ed arrostate (Lee, Wrensch et al. 1997; Huncharek, Kupelnick et al. 2003). Al contrario, un elevato consumo di frutta e verdura fresca, calcio, sodio e ferro sono stati indicati come fattori dietetici protettivi (Blowers, Preston-Martin et al. 1997). Nonostante il suo acclarato ruolo carcinogenico in altri tipi di neoplasie, il fumo non risulta essere associato all'insorgenza di glioblastoma multiforme.

L'unico fattore ambientale incontrovertibilmente associato all'insorgenza di gliomi maligni è l'esposizione a radiazioni ionizzanti sia ambientale che

terapeutica, come dimostrato dai dati relativi al trattamento radioterapico cerebrale dei pazienti leucemici e, in passato, per la tinea capitis, sebbene in quest'ultimo caso venissero impiegate dosi esigue [0.7-2 Gy] (Ron, Modan et al. 1988; Neglia, Meadows et al. 1991). I dati relativi all'oncogenicità delle radiazioni a seguito delle esplosioni atomiche di Hiroshima e Nagasaki non hanno mostrato un significativo aumento dell'incidenza di gliomi, nonostante sia stato osservato un trend in questo senso, allo stesso modo non è stato possibile documentare un aumento dell'incidenza di questa patologia a seguito della fuga radioattiva dalla centrale nucleare di Chernobyl (Tondel, Carlsson et al. 1996; Preston, Ron et al. 2002). È tuttavia possibile che la bassa predisposizione a sviluppare gliomi maligni delle popolazioni coinvolte abbiano potuto avere un ruolo nella sottostima degli effetti dell'esposizione a fall-out nucleari.

Allo stesso modo mancano prove certe di un ruolo patogenetico di campi elettromagnetici, tantomeno di quelli generati dai telefoni cellulari (Wrensch, Yost et al. 1999; Inskip, Tarone et al. 2001). Va altresì escluso un ruolo da parte dei traumi, indicati in passato come possibile causa dell'insorgenza di tumori cerebrali maligni sulla base dello stimolo cicatriziale astrogliale che seguirebbe al danno cerebrale (Hochberg, Toniolo et al. 1984).

È stata descritta un'associazione inversa tra glioma maligno e condizioni patologiche di tipo allergico, autoimmune ed infettivo, probabilmente correlabile con il ruolo svolto dal sistema immunitario nella sorveglianza anti-neoplastica (Brenner, Linet et al. 2002). Sebbene vi siano risultati controversi in proposito, sarebbe da escludere l'associazione con infezioni virali, talvolta diffuse per l'utilizzo di determinati vaccini, da parte dei virus SV40, JCV e BK (Huang, Reis et al. 1999; Ohgaki, Huang et al. 2000; Vilchez, Kozinetz et al. 2003).

I familiari di pazienti affetti da glioma presentano un rischio leggermente aumentato di ammalarsi della medesima patologia, ma tale correlazione non è stata dimostrata con sufficiente forza per quanto riguarda le forme maligne

(Malmer, Gronberg et al. 1999). A riguardo è emblematico il caso dei gemelli monozigoti in cui non si riscontra un aumento del rischio (Miller 1971). Allo stesso modo esistono solo deboli evidenze a suggerire un ruolo per i polimorfismi a carico di geni che codifichino per enzimi deputati alla detossificazione dei carcinogeni chimici – GSTT1 e CYP2D6 – (Elexpuru-Camiruaga, Buxton et al. 1995; Trizna, de Andrade et al. 1998). Non vi sono dubbi invece sulla associazione dei gliomi maligni con sindromi genetiche ereditarie ben precise (Schneider and Victor 1993; Olivier, Goldgar et al. 2003; Zhu, Harada et al. 2005). Tra queste ricordiamo la sindrome di Li Fraumeni, ove è presente una mutazione della linea germinale del gene *p53*, la neurofibromatosi tipo 1 in cui si ritrova una mutazione a livello della *neurofibromina*, la cui corrispettiva proteina è coinvolta nella regolazione della via di segnale cellulare che coinvolge RAS, e la sindrome di Turcot tipo 1 ove la mutazione a livello dei geni *hPMS2*, *hMSH2* o *hMLH1* predispone allo sviluppo di neoplasie neuroepiteliali maligne.

Scenario clinico

Le neoplasie cerebrali costituiscono una notevole sfida per la comunità scientifica per diverse ragioni. Anzitutto si sviluppano all'interno della scatola cranica, in un compartimento isolato dell'organismo umano, ulteriormente separato dal circolo sanguigno sistemico mediante l'interposizione della barriera emato-encefalica. Inoltre, le cellule tumorali mostrano un comportamento particolarmente aggressivo ed infiltrante nell'ambito delle componenti cellulari che normalmente costituiscono i tessuti cerebrali, rendendole un bersaglio estremamente complesso per qualsiasi tipo di terapia. Il miglior trattamento attualmente disponibile per queste lesioni si avvale della resezione chirurgica quanto più radicale possibile associata a chemio e radioterapia (Chamberlain 2006; Olson and Ryken 2008). Purtroppo la recidiva di malattia si ripresenta invariabilmente conducendo a morte il paziente per deterioramento delle

funzioni cerebrali, senza che le terapie di seconda linea possano opporsi in modo concreto alla progressione della malattia.

Nonostante gli entusiasmanti successi riportati in molti ambiti dell'oncologia, la prognosi del GBM non é significativamente cambiata nel corso degli ultimi 30 anni e molti aspetti biologici di queste lesioni neoplastiche sono tutt'ora sconosciuti (Zaidi, Kosztowski et al. 2009).

Dal punto di vista clinico, il GBM si presenta in due forme differenti: il **GBM primario** é una lesione estremamente aggressiva che insorge de novo in età senile (età media 62 anni) mentre il **GBM secondario** si sviluppa a partire da astrocitomi meno maligni in età più precoce (età media 45 anni) e mostra un decorso meno rapido. L'aggiustamento della sopravvivenza per l'età dei pazienti suggerisce che la diversa prognosi potrebbe dipendere dal fatto che il GBM secondario colpisca soggetti in età più giovane e con minori comorbidità. La prevalenza del GBM nel sesso maschile viene meno se si considerano le forme secondarie, a tal proposito non è chiaro se le donne abbiano realmente una maggiore predisposizione verso questa patologia o se piuttosto siano maggiormente inclini ad andare incontro a progressione maligna delle lesioni neoplastiche astrocitarie di basso grado. Analisi genetiche e di proteomica hanno confermato l'esistenza di due forme distinte, nell'ambito della stessa patologia (Tso, Freije et al. 2006; Ohgaki and Kleihues 2007).

La rilevanza degli studi volti ad identificare dei marcatori biologici che possano essere attribuiti ad una particolare forma di GBM dipende dalla notevole variabilità delle risposte individuali alle terapie. Accanto a situazioni in cui le lesioni neoplastiche si presentano all'attenzione del clinico in uno stadio molto avanzato, con un comportamento estremamente aggressivo, talora con forme multicentriche di impossibile risoluzione chirurgica che portano i pazienti al decesso in pochi mesi nonostante le terapie, esistono condizioni, indistinguibili dal punto di vista istologico, in cui invece le lesioni paiono avere un

comportamento più indolente che consente periodi di sopravvivenza decisamente più lunghi della media. Il fatto stesso che le terapie utilizzate producano effetti così diversi in pazienti altrimenti indistinguibili a priori, pone il problema che ci si possa trovare in realtà di fronte a sottogruppi di pazienti con condizioni patologiche distinte. Nonostante gli sforzi compiuti dai patologi abbiano portato a un miglioramento delle capacità diagnostiche, va detto che la diagnosi istologica rimane un momento particolarmente delicato e probabilmente ancora non del tutto affidabile nella gestione di tali pazienti. Sebbene si sia tentato di raggiungere un consenso sugli aspetti morfologici caratteristici delle varie lesioni, è esperienza comune che le neoplasie cerebrali, compresi i GBM, si presentino in una gran varietà di forme istologiche e che i criteri diagnostici recentemente suggeriti dal OMS (Louis, Ohgaki et al. 2007) siano ancora artificiosi e ben lungi dal consentire di discriminare con sicurezza le diverse forme istologiche. A riprova di quanto detto vi sono i dati relativi all'accuratezza diagnostica istologica che offrono uno scenario piuttosto deludente poiché, in varie casistiche, la concordanza diagnostica tra centri periferici e centri di riferimento è piuttosto bassa (Stupp, Tonn et al. 2010).

Quanto detto vale naturalmente per i casi di più semplice diagnosi, ovvero quelli che vengono sottoposti ad intervento chirurgico e per i quali esiste generalmente una quantità cospicua di tessuto neoplastico a disposizione. Accanto a questi casi "ideali" esistono una miriade di situazioni cliniche in cui il tessuto a disposizione è piuttosto esiguo, se non inesistente. L'evoluzione tecnologica ha comportato una modifica radicale delle tecniche chirurgiche che sono divenute estremamente delicate ma che rendono più complesso il prelievo di grandi quantità di tessuto. Inoltre, nei casi in cui non si pone per vari motivi l'indicazione alla resezione chirurgica, sono divenute popolari procedure bioptiche stereotassiche sia a cielo aperto che mediante ago che necessariamente portano ad una riduzione del tessuto a disposizione del patologo. I dati derivati dall'esperienza nelle biopsie stereotassiche con ago

hanno inoltre messo in evidenza come esista una notevole variabilità diagnostica a seconda della regione della lesione che venga prelevata, poichè i GBM mostrano per loro natura un coacervo di quadri istologici nell'ambito della medesima lesione (Woodworth, McGirt et al. 2005).

Pertanto, è divenuto di primaria importanza concentrare gli sforzi della comunità scientifica verso un più preciso inquadramento nosologico di questa patologia. Questo aspetto è di assoluta rilevanza in quanto non è limitato ad una questione puramente accademica e formale ma ha delle ripercussioni di eccezionale portata sulla concomitante ricerca di nuove terapie. È evidente che, se ci si trova di fronte ad una serie di condizioni patologiche distinte che, per nostro difetto, raggruppiamo sotto l'unica denominazione di GBM, sarà ben difficile che un'unica terapia possa risultare veramente efficace in tutti i casi. I dati raccolti grazie ad innovative metodiche di genomica e proteomica sono assolutamente illuminanti in proposito. È noto da diversi anni che, ad esempio, la divisione clinica tra forme primitive e forme secondarie, proposta sin dalla prima metà del novecento (Peiffer and Kleihues 1999), trovi una ragion d'essere anche a livello molecolare (Tso, Freije et al. 2006; Ohgaki and Kleihues 2007) (Fig. 1).

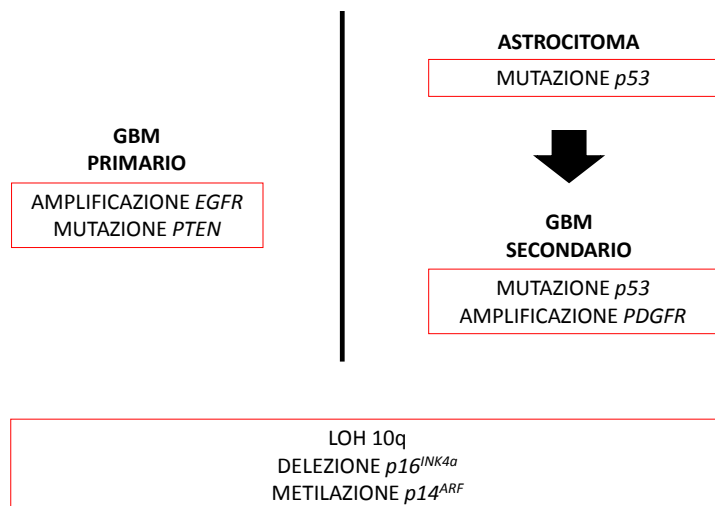


Fig. 1: La suddivisione classica in GBM primari e secondari trova un riscontro nel loro diverso profilo genetico. La mutazione di *p53* è un evento precoce negli astrocitomi che progrediscono verso la forma secondaria di GBM. La perdita di eterozigosi a livello del cromosoma 10, la delezione del gene *p16^{INK4a}* e la metilazione di *p14^{ARF}* sono comuni alle due forme di glioblastoma.

Caratteristiche genetiche

I GBM primari mostrano un profilo genetico caratterizzato dall'amplificazione del gene *EGFR* (codificante il recettore per EGF) o da una sua attivazione costitutiva a seguito di mutazione e dalla mutazione del gene *PTEN*. Entrambi i geni sono coinvolti nella via di segnale cellulare che fa capo a mTOR e che è implicata nella proliferazione cellulare.

I GBM secondari, invece, mostrano caratteristicamente mutazioni a carico del gene *p53*, implicato nel controllo della progressione del ciclo cellulare a seguito di condizioni di danno cellulare o di iperproliferazione ed a carico del gene *PDGFR*.

Accanto a queste "lesioni" geniche ve ne sono altre che sono comuni alle due forme di GBM: in particolare la perdita di eterozigosi a livello del cromosoma 10, ove si suppone la presenza di geni oncosoppressori, e la delezione del gene *p16^{INK4a}*, implicato nella via di segnale che fa capo al noto oncosoppressore RB. È interessante notare che mentre la perdita di eterozigosi a livello del cromosoma 10 si associa a tutte le altre lesioni descritte, esiste un'associazione inversa tra la presenza di danno a livello di *EGFR*, *PTEN* e *p53* mentre la presenza della delezione di *p16^{INK4a}* correla positivamente con l'amplificazione di *EGFR*. Queste osservazioni fanno supporre che esista un susseguirsi di danni genetici che vanno accumulandosi prima dell'insorgenza della neoplasia, sebbene non sia ancora stata chiarita la sequenza secondo la quale questi danni avverrebbero. In linea generale è possibile affermare che sia nei GBM primari che nei secondari sono presenti alterazioni a livello di geni connessi con la regolazione della mitosi, della trasduzione di messaggi proliferativi extracellulari e dell'apoptosi. Analisi quantitative hanno consentito di dimostrare che nei GBM primari sono maggiormente coinvolti geni legati alla trasduzione di messaggi proliferativi extracellulari ed alla risposta stromale alle cellule neoplastiche. Si riscontra infatti un profilo genico caratterizzato dalla presenza di geni legati ai processi

infiammatori, alla coagulazione, alla risposta immunitaria ed all'attivazione del complemento, all'angiogenesi, al rimodellamento della matrice extracellulare, alle risposte antiossidanti ed antiapoptotiche. È infine piuttosto singolare l'espressione di marker genici tipicamente espressi in tessuti mesenchimali, che fanno supporre un ruolo di primo piano della risposta stromale alla neoplasia nella patogenesi dei GBM primari.

Nei GBM secondari, invece, prevalgono geni legati alla regolazione della mitosi e della progressione del ciclo cellulare, della sintesi di DNA, della motilità del fuso mitotico, della funzione del cinetocoro, della regolazione della conformazione tridimensionale del DNA, della segregazione dei cromatidi e della condensazione mitotica dei cromosomi.

Si esclude che tali differenze siano da ascrivere agli effetti di precedenti terapie antineoplastiche ed inoltre i dati raccolti hanno evidenziato come circa il 50% delle neoplasie inquadrare clinicamente come GBM primari avessero in realtà il trait genico tipico dei GBM secondari, facendo supporre una progressione a partire da lesioni di minore malignità, senza che questo evento fosse stato clinicamente rilevabile.

Alla luce di quanto sinora esposto, è chiaro che i criteri diagnostici attualmente in nostro possesso siano quantomai inadeguati ad identificare sottogruppi di pazienti che potrebbero beneficiare di terapie diverse.

Sottotipi di GBM

Gli sforzi in questo senso sono stati evidentemente notevoli poichè il National Institute of Health, principale finanziatore della ricerca pubblica negli Stati Uniti, ha inserito lo studio genetico dei GBM tra le priorità di intervento nell'ambito del progetto pilota "The Cancer Genome Atlas", nel tentativo di giungere ad una svolta nella gestione di tali pazienti.

Grazie a questo intervento si è verificato un cambiamento epocale nell'ambito della ricerca in questo campo, dovuto ad un'evoluzione metodologica di grande rilievo. Piuttosto che proseguire sulla strada precedentemente intrapresa, che mirava a caratterizzare prevalentemente le due forme cliniche di GBM precedentemente citate, si è ritenuto di dover procedere senza pregiudizio alla caratterizzazione molecolare estensiva delle lesioni diagnosticate come GBM (Network 2008; Parsons, Jones et al. 2008; Kanu, Hughes et al. 2009; Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010; Verhaak, Hoadley et al. 2010). Questo tipo di approccio, reso possibile solo in tempi recenti dalla disponibilità di metodiche di laboratorio adatte ad esaminare l'intero genoma in tempi ragionevoli, hanno consentito di effettuare delle complicate correlazioni statistiche dei dati ottenuti che hanno sorprendentemente portato alla definizione di sottogruppi di pazienti sinora sconosciuti, sulla base delle anomalie genetiche presenti nel tessuto neoplastico.

La maggior parte dei GBM mostrano delle anomalie genetiche a livello di *p53*, *RB1*, e dei recettori ad attività tirosinocinasica facendo supporre un coinvolgimento delle vie di segnale cellulare implicate. Inoltre, è emersa una suddivisione in 4 sottogruppi sulla base di specifiche alterazioni geniche: classico, mesenchimale, proneurale, neurale (Fig. 2).

Il **sottotipo classico** si caratterizza per l'amplificazione di *EGFR* a livello del cromosoma 7, per la presenza della variante 3 della mutazione del medesimo recettore (*EGFRVIII*), per una delezione a carico di *PTEN*, localizzato sul cromosoma 10, per una delezione in omozigosi del braccio corto del cromosoma 9 con coinvolgimento di *CDKN2A* (*p16^{INK4A}* e *p14^{ARF}*). Caratteristicamente il sottotipo classico presenta una normale funzionalità di *p53* e l'espressione di markers di staminalità quali *NES*, *NOTCH* e *Sonic Hedgehog*.

Il **sottotipo mesenchimale**, invece, presenta una diminuita espressione di *NF1* sul cromosoma 17 e di *PTEN*, entrambi implicati nella via di segnale che converge a livello di AKT. Inoltre si osserva un'aumentata espressione dei geni della famiglia

NF-kB, a suggerire un ruolo preminente dei processi di necrosi e dell'associata risposta infiammatoria in questo sottogruppo di pazienti. Infine, la transizione verso un fenotipo mesenchimale è giustificata dalla iperespressione dei markers tipici delle cellule di tipo mesenchimale: *CHI3L1*, *MET*, *CD44* e *MERTK*.

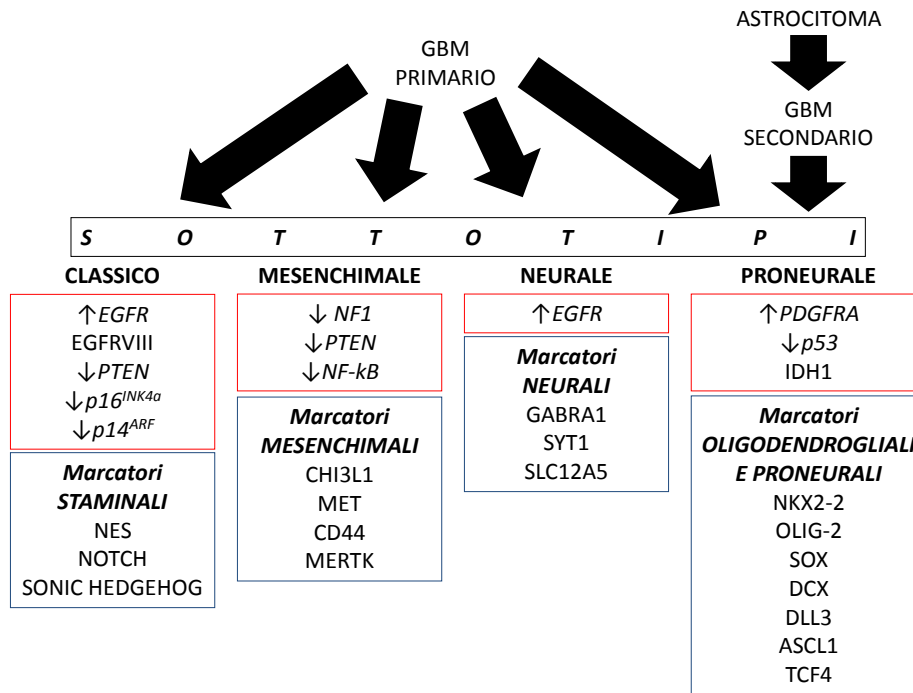


Fig. 2: L'analisi estensiva dell'espressione genica dei GBM consente di discriminare 4 sottotipi della neoplasia. Le forme cliniche secondarie mostrano invariabilmente il profilo genico del sottotipo proneurale mentre le forme primarie sono caratterizzate da lesioni genetiche più eterogenee.

Il **sottotipo proneurale** si caratterizza per una peculiare inattivazione di *p53*. Al contempo si osserva l'iperespressione di *PDGFRA*. La frequente mutazione a livello di *IDH1*, il cui significato è tuttavia lungi dall'essere chiarito, parrebbe correlabile con uno spostamento del metabolismo verso la via anaerobia con reclutamento delle risposte cellulari tipiche dell'ipossia, pur in assenza di essa, e conseguente stimolazione della neoangiogenesi. In ogni caso la mutazione di *IDH1* è risultata essere associata alle forme secondarie di GBM e ad una migliore prognosi. L'espressione di markers tipici di cellule della serie oligodendrocitica (*PDGFRA*, *NKX2-2* ed *OLIG2*) e proneurale (*SOX*, *DCX*, *DLL3*, *ASCL1* e *TCF4*)

suggeriscono un ruolo preminente delle vie di segnale implicate nello sviluppo e nella differenziazione del sistema nervoso.

L'ultimo **sottotipo, neurale**, si caratterizza per l'espressione di markers neuronali (*NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* ed *SLC12A5*), nonostante la scarsa presenza nei campioni analizzati di cellule cerebrali normali.

La correlazione tra i profili genetici dei campioni di GBM e quelli di cellule normali che popolano il sistema nervoso in varie fasi del suo sviluppo ha mostrato una notevole sovrapposizione tra i markers del sottotipo classico e quelli degli astrociti, tra sottotipo mesenchimale e cellule astrogliali in coltura e tra sottotipo proneurale ed oligodendrociti. Il sottotipo neurale, invece, ha mostrato una notevole correlazione con vari tipi cellulari, dagli astrociti, agli oligodendrociti, ai neuroni. È possibile che questa correlazione possa indicare una diversa cellula di origine, o quantomeno un diverso stadio di maturazione della stessa nel momento in cui avviene la trasformazione neoplastica. Da un punto di vista clinico i dati relativi a questa innovativa suddivisione in sottotipi del GBM non sono ancora di qualità sufficiente a consentire di trarre delle conclusioni. Tuttavia, è già emersa una correlazione tra necrosi infiammatoria ed espressione del sottotipo mesenchimale. Inoltre, la maggior parte dei GBM secondari paiono appartenere al sottogruppo proneurale. Questo gruppo di pazienti non solo presenta un'andamento clinico più indolente, ma risulta anche il più refrattario alle terapie intraprese, indicando la necessità di esplorare la possibilità di sviluppare un trattamento personalizzato. La metilazione del gene *MGMT* non è risultata associata con un sottogruppo particolare, costituendo una variabile indipendente della risposta alla terapia. I dati ottenuti dai campioni prelevati direttamente da pazienti sono sovrapponibili a quelli ricavati da xenotrapianti su animali da esperimento mentre non è stato possibile trovare una corrispondenza nell'analisi delle linee cellulari comunemente utilizzate nella ricerca di laboratorio in vitro. Questo ultimo aspetto pone degli interrogativi

riguardo alla validità dei risultati sperimentali in vitro rispetto alla realtà clinica che essi intendono riprodurre.

Nell'ambito della suddivisione dei GBM in sottotipi, un ulteriore contributo è giunto da gruppi di ricerca che si sono piuttosto occupati della proteomica dei tumori cerebrali, dimostrando come non esista necessariamente una fedele corrispondenza tra l'alterazione dell'espressione genica e quella dei livelli delle corrispondenti proteine (Brennan, Momota et al. 2009). Queste, infatti, risentono di una ulteriore regolazione a livello trascrizionale, traduzionale e di maturazione che può essere influenzata da fattori non immediatamente evidenti alla semplice analisi genetica. In particolare, è stata confermata la possibilità di suddividere i GBM in 3 classi, escludendo l'esistenza di marcatori che potessero identificare il sottotipo neurale precedentemente individuato (Fig. 3).

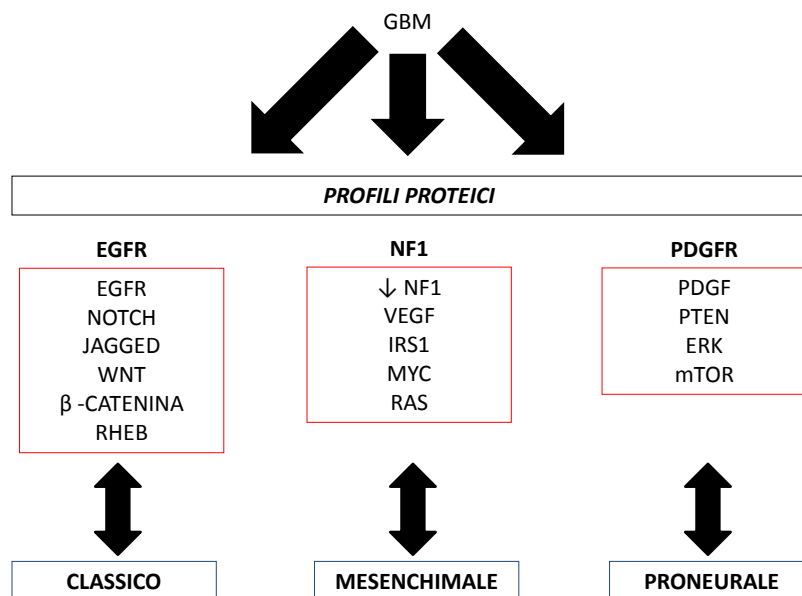


Fig. 3: Metodiche di proteomica mostrano 3 diversi profili caratteristici dei glioblastomi. Lo schema mostra la corrispondenza tra i profili proteici e quelli genici precedentemente descritti. Alla luce dei profili proteici non è stata confermata l'esistenza del sottotipo neurale.

Le proteine chiave nella identificazione dei sottotipi di GBM appartengono a 3 diverse vie di segnale: EGFR, NF1 e PDGF. Queste riflettono la suddivisione nei sottotipi classico (EGFR), mesenchimale (NF1) e proneurale (PDGF). È

interessante notare che l'applicazione di criteri più stringenti (supervised piuttosto che unsupervised clustering) all'analisi genetica dei medesimi campioni, sulla base dei risultati suggeriti dall'analisi proteomica, porta all'esclusione dell'esistenza di un sottotipo neurale anche a livello di trait genico. È verosimile che questo dato indichi che solo determinate caratteristiche geniche vengano a riflettersi sui livelli delle proteine che poi costituiscono le varie vie di segnale cellulare, e che pertanto le metodiche di genomica debbano sempre essere affiancate a quelle di proteomica nel tentativo di definire con maggior precisione gli elementi caratteristici dei vari sottotipi di GBM. Infatti, l'espressione di un gene non indica necessariamente l'attivazione della relativa via di segnale, a causa dell'intervento di numerose modulazioni traduzionali e post-traduzionali.

Alterazioni delle vie di segnale cellulare

Sulla base dei dati raccolti sinora è possibile, sistematizzando, identificare le vie di segnale cellulare che sono maggiormente coinvolte nello sviluppo dei GBM e che si suppone possano essere il punto di partenza per lo sviluppo di nuove terapie molecolari (Kanu, Hughes et al. 2009; Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010).

Una cascata di segnali intracellulari che riveste sicuramente un ruolo importante nella patogenesi dei GBM è quella innescata dai **recettori ad attività tirosin-chinasica** per i fattori di crescita EGFR e PDGFR (Libermann, Nusbaum et al. 1985; Hermanson, Funa et al. 1992). In condizioni di fisiologia cellulare tali recettori vengono stimolati dai fattori di crescita corrispondenti ed attivano in parallelo diverse vie di segnale (Fig. 4).

Una di queste coinvolge la **fosfatidil-inositolo-3-chinasi (PI3K)**. L'attivazione della PI3K conduce alla stimolazione dell'attività della proteina chinasi B (PKB, AKT), che stimola la crescita cellulare attraverso l'attivazione di RHEB e mTOR. Al contempo, AKT svolge una azione anti-apoptotica inibendo direttamente la funzione di molecole pro-apoptotiche quali BAD, procaspasi e forkhead-1.

L'attività della PI3K si esplica anche attraverso la cascata di segnale che coinvolge RAC e RHO, implicate nei fenomeni di motilità e migrazione cellulare. Il segnale della via PI3K/RAC/RHO viene modulato dall'intervento di NF2 (Shaw, Paez et al. 2001). L'attivazione di PI3K e delle cascate molecolari che ad essa conseguono è modulata dall'intervento di PTEN, una proteina ipoespressa in molti casi di GBM (Myers, Pass et al. 1998).

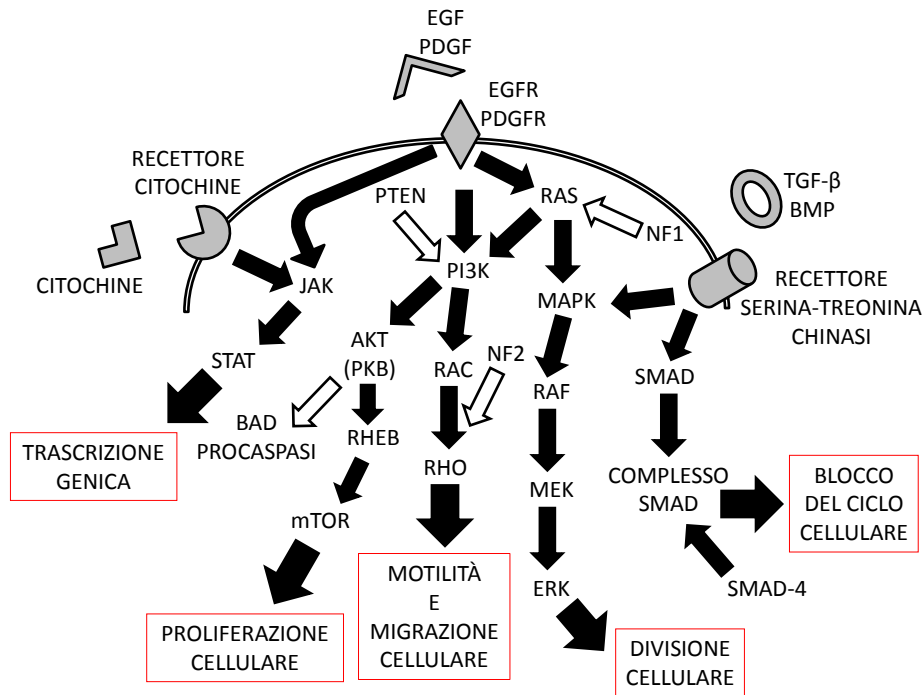


Fig. 4: I recettori di membrana per le citochine e ad attività chinasi sono responsabili del reclutamento di una moltitudine di vie di segnale cellulare. Gli effetti sul metabolismo cellulare dipendono dalle interrelazioni esistenti tra le varie cascate di segnale. Le frecce nere indicano un'azione stimolatoria mentre le bianche inibitoria.

Un'altra via di segnale, reclutata dall'attivazione dei recettori per i fattori di crescita, è quella che provoca l'attivazione della proteina **RAS** (Guha, Feldkamp et al. 1997). La funzionalità di RAS è regolata dall'intervento della proteina NF1 che, come è noto, è alterata in alcuni casi di GBM (Cichowski and Jacks 2001; Harrisingh and Lloyd 2004). RAS svolge un ruolo di primo piano nella trasmissione dei segnali di proliferazione cellulare: sia direttamente attraverso l'attivazione della via delle MAP chinasi (MAPK), sia per il coinvolgimento della

via della PI3K, già discussa in precedenza. La cascata delle MAPK porta, attraverso l'attivazione di molecole intermedie quali RAF, MEK ed ERK, alla divisione cellulare (Chang, Steelman et al. 2003).

Una terza cascata di segnale, conseguente alla stimolazione dei recettori EGFR e PDGFR, coinvolge le molecole **JAK e STAT** (Kanu, Hughes et al. 2009).

Un'altro recettore di membrana implicato nella modulazione di segnali intracellulari è il **recettore per TGF- β** . Esso agisce attraverso la cascata di SMAD portando alla differenziazione ed all'arresto della crescita cellulare, per il suo effetto sulle cicline nucleari (Johnson, Jennings et al. 1993; Matsuura, Denissova et al. 2004). Accanto a questo effetto sono state tuttavia descritte delle situazioni in cui l'attivazione del recettore di TGF- β sia in grado di stimolare in parallelo l'attività mitogenica di MAPK (Jennings, Hart et al. 1997). Inoltre, sono stati osservati effetti di inibizione dell'espressione delle proteine di adesione cellulare e della transizione epitelio-mesenchimale (Merzak, McCrea et al. 1994; Paulus, Baur et al. 1995). Questi dati suggeriscono un ruolo preminente della via del TGF- β nella migrazione cellulare e nei fenomeni di invasione tipici del GBM.

Un'altra cascata di segnale cellulare è quella del **sistema NOTCH** (Baron 2003; Ehebauer, Hayward et al. 2006). Essa prevede la presenza di recettori di membrana NOTCH che vengono stimolati dal legame con le proteine Jagged e Delta (Fig. 5). L'attivazione del recettore porta al reclutamento di una serie di proteasi, tra cui la presenilina-1, che esitano con il clivaggio di una porzione intracellulare del recettore che funge da secondo messaggero a livello nucleare per stimolare la proliferazione cellulare. La peculiarità del sistema NOTCH risiede nel fatto che esso è di comprovata importanza nell'ambito dello sviluppo del sistema nervoso ed, al contempo, coinvolto nella regolazione della proliferazione cellulare in vitro ed in vivo, oltre che essere attivato costitutivamente in numerosi casi di GBM (Gaiano, Nye et al. 2000; Purow, Haque et al. 2005; Androutsellis-Theotokis, Leker et al. 2006).

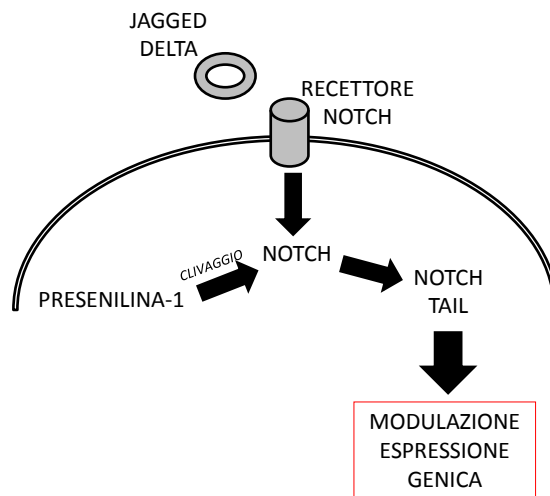


Fig. 5: Attivazione della cascata di segnale di NOTCH a seguito del legame di Jagged e Delta al recettore di membrana.

Un'ultimo meccanismo cellulare legato all'attività di recettori di membrana è quello che coinvolge la **β -catenina** (Yano, Hara et al. 2000). In condizioni normali essa si trova allo stato fosforilato inattivo. Il legame di WNT al suo recettore Frizzled recluta la proteina Dishevelled che inibisce la fosforilazione della β -catenina attivandola. L'attività di β -catenina si esplica a diversi livelli ed a livello nucleare favorisce la progressione del ciclo cellulare (Fig. 6).

Nella patogenesi dei GBM, oltre al coinvolgimento di vie di segnale legate all'attività di recettori di membrana, e comunque a monte della modulazione dell'espressione genica, esistono lesioni che colpiscono i circuiti molecolari intracellulari responsabili della regolazione della progressione del ciclo cellulare e della proliferazione.

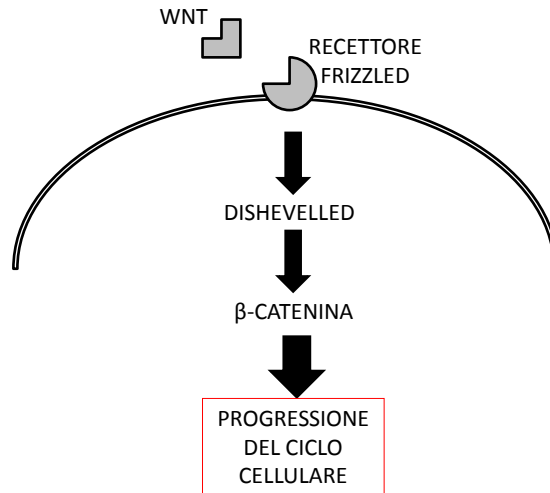


Fig. 6: La cascata di segnali che coinvolge la β -catenina.

I due sistemi di controllo della proliferazione più frequentemente alterati nelle cellule di GBM sono quelli che fanno capo a p53 ed RB (Fig. 7).

p53 è una proteina che interviene nella regolazione del ciclo cellulare e che viene espressa in corso di danno al DNA, in corso di stress cellulare o in presenza di tossine. Il suo ruolo è quello di bloccare la progressione del ciclo cellulare per favorire i processi riparativi sul genoma (Sherr and Weber 2000; Matheu, Maraver et al. 2008). Laddove questi non fossero sufficienti, p53 è in grado di indurre l'apoptosi svolgendo una funzione di oncosoppressore. La funzione di p53 è favorita in presenza della proteina p14^{ARF} che la stabilizza, favorendone gli effetti sul gene *P21*. Al contrario, MDM2 blocca l'azione di p53 consentendo la progressione attraverso le varie fasi del ciclo cellulare. Nelle cellule di GBM sono descritte lesioni inattivanti a carico di p53 e di p14^{ARF}, nonché iperespressione di MDM2 (He, Reifenberger et al. 1994; Nakamura, Watanabe et al. 2001).

RB controlla la progressione del ciclo cellulare agendo sul fattore nucleare E2F1 (Sherr and Roberts 1999; Paternot, Bockstaele et al. 2010).

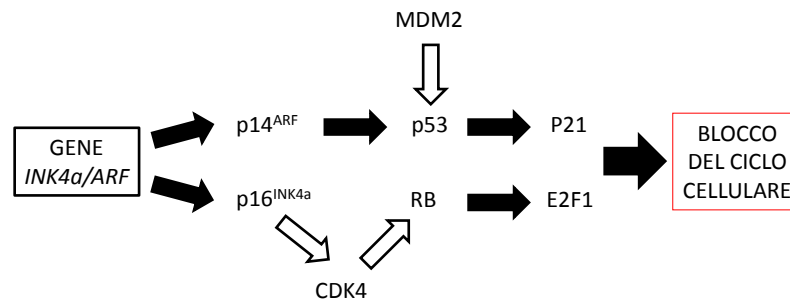


Fig. 7: Il controllo del ciclo cellulare da parte di p53 ed RB è spesso alterato nelle cellule di GBM. Le due vie di segnale mostrano uno stretto legame poiché lo stesso locus genico codifica per proteine coinvolte in entrambe. Le frecce bianche indicano un segnale di tipo inibitorio mentre quelle nere di tipo stimolatorio.

RB viene inattivata dall'intervento della chinasi ciclino-dipendente 4 (CDK4) che provvede a favorire la progressione del ciclo cellulare, oltre che l'espressione di geni anti-apoptotici come Bcl-2 (Gomez-Manzano, Mitlianga et al. 2001). A sua volta, CDK4 viene inattivata dal legame con p16^{INK4a}. Il risultato finale è che sia RB che p16^{INK4a} bloccano la progressione del ciclo cellulare mentre CDK4 la favorisce. Come nel caso della via di p53, anche per RB sono descritte numerose lesioni in cellule di GBM. L'aspetto sorprendente di queste due vie di segnale, tuttavia, è che p16^{INK4a} e p14^{ARF} sono prodotti per splicing alternativo dallo stesso locus genico *INK4a/ARF* sul braccio corto del cromosoma 9 (Stott, Bates et al. 1998). Pertanto, una inattivazione genica a questo livello, piuttosto frequente nei GBM, colpisce al contempo due vie di segnale molto rilevanti per la regolazione della crescita e della proliferazione cellulari (Labuhn, Jones et al. 2001).

In una progressione ideale del segnale di crescita e proliferazione cellulare, dalla stimolazione dei recettori di membrana, all'attivazione di molteplici cascate di segnale intracellulari, sino alla modulazione dell'espressione genica, vi è un ultimo elemento che deve necessariamente essere modificato nelle cellule neoplastiche: il **meccanismo dell'apoptosi**.

È questo un sistema di controllo della proliferazione cellulare che interviene ogniqualvolta la cellula si trovi in una condizione di danno genetico non

riparabile provocandone la morte secondo una sequenza programmata di eventi (Elmore 2007). Si distinguono due diverse vie attraverso le quali l'apoptosi può essere attivata: estrinseca ed intrinseca (Fig. 8).

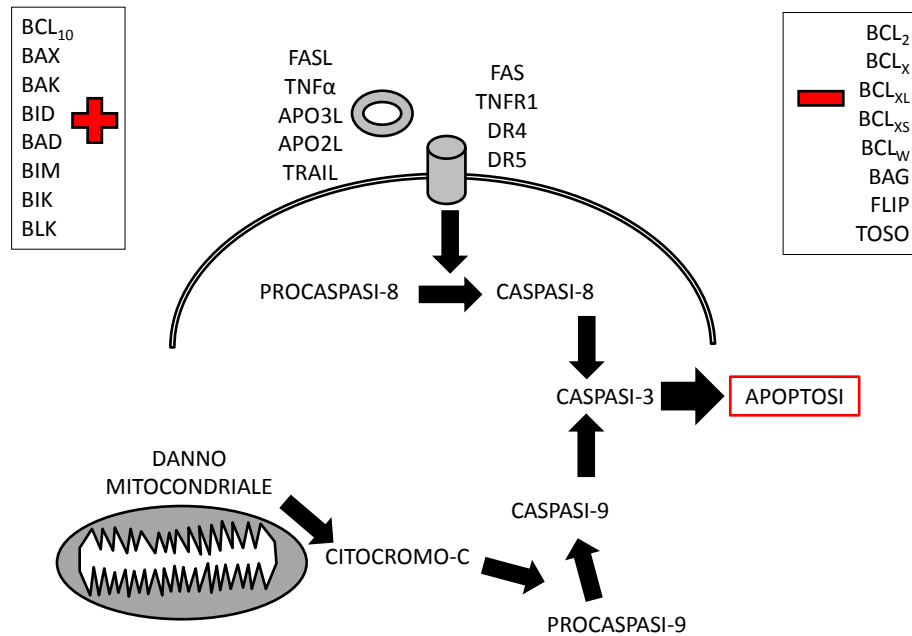


Fig. 8: Meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza dell'apoptosi. La via estrinseca è innescata dall'attivazione di specifici recettori della membrana cellulare mentre la via intrinseca è attivata a seguito di danno mitocondriale. La figura mostra alcune proteine coinvolte nella modulazione in senso stimolatorio (+) ed inibitorio (-) del processo apoptotico.

La via estrinseca viene così detta poiché viene attivata ad opera di segnali extracellulari che stimolano determinati recettori. Le combinazioni ligando/recettore più note sono sicuramente FASL/FASR, TNF- α /TNFR1, APO3L/DR3, APO2L/DR4 ed APO2L/DR5. L'attivazione del recettore porta al legame con proteine citoplasmatiche che formano un complesso proapoptotico che agisce a sua volta a livello della procaspasi 8, convertendola in caspasi attiva. La via estrinseca può essere modulata dall'intervento delle proteine Flip e Toso.

La via intrinseca, invece, può essere attivata da una serie di segnali non recettoriali. Costituisce tipicamente la risposta ad un danno cellulare indotto da stress, radiazioni ionizzanti e radicali liberi dell'ossigeno. Il danno cellulare induce

un aumento della permeabilità della membrana mitocondriale esterna con rilascio a livello citoplasmatico di molecole quali Citocromo C e SMAC/DIABLO. Queste proteine attivano la procaspasi 9, la via finale comune della via intrinseca. La via intrinseca viene modulata dall'intervento di proteine pro- (BCL₁₀, BAX, BAK, BID, BAD, BIM, BIK e BLK) ed anti-apoptotiche (BCL₂, BCL_X, BCL_{XL}, BCL_{XS}, BCL_W, BAG) appartenenti alla famiglia di BCL₂.

Caspasi 8 e caspasi 9 attivano la via effettrice dell'apoptosi, comune alle due vie di innesco, attraverso l'attivazione della caspasi 3. Le caspasi sono delle proteasi che, oltre ad esercitare la loro azione sulle proteine strutturali cellulari, hanno la caratteristica di attivare altre caspasi sino a formare una vera e propria cascata di amplificazione che porta all'attivazione di ulteriori proteasi ed endonucleasi. Il reclutamento coordinato di tutte queste proteine esita nella rapida demolizione delle strutture cellulari comunemente osservata durante l'apoptosi. Come le altre vie di segnale descritte, anche quella apoptotica è alterata nelle cellule di glioblastoma. p53 è un induttore dell'apoptosi che viene spesso ipoespresso nelle cellule di GBM. Inoltre, le caspasi possono mostrare delle mutazioni inattivanti (Li, Tzeng et al. 2006), mentre NFκB è un fattore antiapoptotico che induce l'espressione di BCL₂ e BCL_{XL} e che risulta essere iperespresso in corso di GBM (Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010).

Le numerose lesioni geniche caratteristiche dei GBM, se da un lato possono essere messe in relazione all'alterazione di specifiche vie di segnale cellulare che conducono alla loro insorgenza, dall'altro testimoniano una instabilità genetica di base che predisporrebbe le cellule alla trasformazione maligna. A riguardo sono stati descritti almeno quattro **meccanismi di riparazione del DNA** (riparazione per escissione di base, riparazione per escissione di nucleotidi, riparazione del mismatch e riparazione di difetti di ricombinazione) che sono difettosi nelle cellule di GBM e che pertanto spiegano il progressivo accumularsi dei danni genetici precedentemente illustrati (Loeb 1991; Hoeijmakers 2001). Particolarmente indicativo è il caso dell'enzima O₆-metilguanina-DNA-

metiltrasferasi (MGMT) che è implicato nella rimozione di gruppi alchilici dalla posizione O₆ della guanina. I livelli di MGMT nelle cellule di GBM sono nettamente superiori a quelli di cellule normali ed aumentano ulteriormente a seguito di terapie alchilanti (Friedman, McLendon et al. 1998; Silber, Bobola et al. 1998). Inoltre, l'ipoproduzione dell'enzima mediante metilazione del promotore è stata correlata ad un aumento del numero di lesioni genetiche associate, dato il suo ruolo antimutagenico, nonché ad una migliore risposta clinica alle terapie antineoplastiche (Nakamura, Watanabe et al. 2001; Hegi, Diserens et al. 2005).

Sebbene la disregolazione a livello delle intricate vie di segnale intracellulare sia di straordinaria importanza nel determinare l'insorgenza del GBM, altrettanto si può dire delle vie di segnale intercellulare. A questo riguardo è emblematico il caso della **neoangiogenesi**, che deve necessariamente accompagnare lo sviluppo della neoplasia e che avviene grazie al consolidamento di una serie di circuiti molecolari in parallelo che favoriscono la proliferazione vascolare (Lopes 2003).

L'esempio più semplice di questo fenomeno prevede la produzione esagerata, da parte delle cellule di GBM, di fattori pro-angiogenici (VEGF-A in testa ma anche di bFGF, angiopoietine, PDGF, IL-8) che vanno ad esercitare una azione stimolante a livello di specifici recettori presenti a livello delle cellule endoteliali. Questa dimensione biologica del GBM occupa un posto rilevante nella ricerca poiché l'interferenza con tali segnali intercellulari offre una possibilità concreta di bloccare la crescita della massa tumorale. Difatti, un agente anti-VEGF-A, il bevacizumab (Avastin[®], Genentech/Roche) si è dimostrato estesamente efficace nelle prime esperienze cliniche nell'incrementare la percentuale di pazienti liberi da malattia a 6 mesi a valori compresi tra il 32% ed il 64%, rispetto al valore di 21% ottenuto con le terapie attualmente disponibili (Cohen, Shen et al. 2009). Tuttavia questo approccio, sebbene possa rappresentare un notevole passo avanti, ha messo in evidenza alcuni limiti legati alla progressione della malignità delle lesioni trattate, ad indicare la presenza di sistemi di segnale in parallelo che entrano in azione a fronte di una interferenza esterna esercitata su uno di essi. È

possibile che la combinazione di diverse terapie molecolari possa sortire migliori effetti ma, al di là del dato specifico, interessa in questa sede sottolineare come l'approccio molecolare della terapia rappresenti sicuramente una svolta nel panorama oncologico che dipende dalle capacità della ricerca di base di chiarire nel dettaglio le vie di segnale implicate nella fisiologia e nella patologia cellulare e di interferire su di esse.

Terapia genica

Alla luce di quanto esposto, è chiaro che la terapia genica costituisca un'opzione molto promettente nel panorama del trattamento dei gliomi cerebrali maligni. Questo tipo di terapia sembrerebbe la risposta più adatta alla patologia che trattiamo, dal momento che è volta a correggere le alterazioni dell'espressione dei geni implicati nel metabolismo e nelle vie di segnale cellulare che parrebbero alla base dell'insorgenza dei gliomi maligni. Tuttavia, nonostante gli incoraggianti successi riportati da tale tipo di trattamento per patologie di altra natura, non sono noti ad oggi casi in cui la terapia genica sia stata in grado di contrastare in modo efficace la patologia neoplastica (Cavazzana-Calvo, Hacein-Bey et al. 2000). Cionondimeno, le ricerche svolte in questo ambito sono caratterizzate da alcuni segnali positivi che le rendono particolarmente promettenti.

In linea generale, la terapia genica si basa sulla possibilità di trasferire alle cellule del paziente un gene di interesse che presenti in esse dei difetti o che possa essere utile nel trattamento della patologia in questione (Fig. 9).

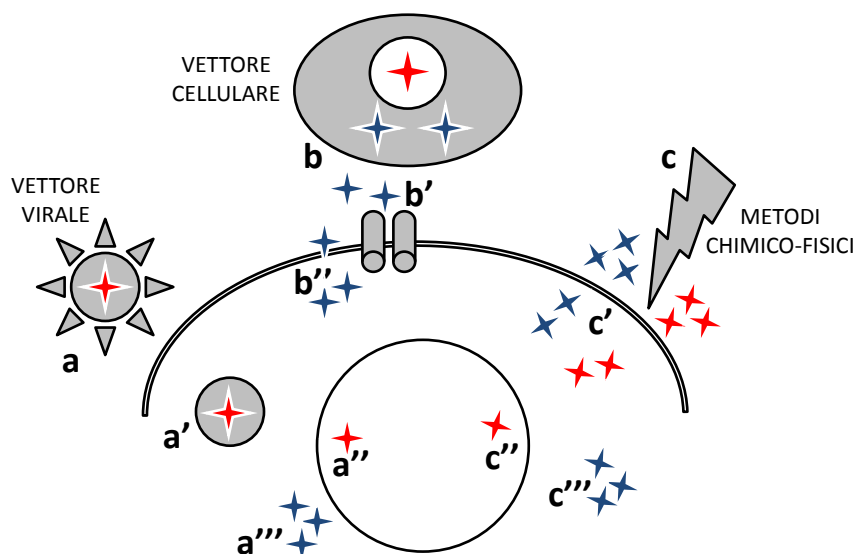


Fig. 9: La terapia genica si basa sulla somministrazione mirata di geni o delle proteine codificate. La trasduzione mediante vettori virali (a) prevede l'adsorbimento del vettore alla cellula (a') e la espressione del transgene (a'') con produzione, da parte della cellula, della proteina transgenica (a'''). L'utilizzo di vettori cellulari (b) consente la produzione della proteina transgenica che svolge effetti sia mediati (b') che indipendenti dai recettori di membrana (b''). I metodi chimico-fisici (c) consentono la permeabilizzazione della cellula bersaglio alla proteina transgenica ed al transgene di interesse (c'). Quest'ultimo, giunto nel nucleo (c''), potrà codificare per la proteina corrispondente (c'''). Le stelle rosse indicano il transgene mentre quelle blu la proteina transgenica.

Tale procedura, piuttosto semplice dal punto di vista concettuale, deve misurarsi con aspetti tecnici e procedurali piuttosto complessi. In particolare, i punti deboli della terapia genica sono stati sinora la difficoltà a trasferire il gene candidato all'interno delle cellule del paziente e, in secondo luogo, a garantire un'espressione fisiologica prolungata nel tempo di tale gene.

Vettori di terapia genica

Entrambi gli aspetti hanno in qualche misura a dipendere dal vettore utilizzato per veicolare il gene in questione nell'organismo ricevente. Inoltre, un veicolo efficace deve rispondere necessariamente ad un'esigenza di selettività topografica: in una situazione ideale il gene terapeutico dovrebbe venire trasferito solo nelle cellule tumorali, consentendo di superare i limiti manifestati

dalle terapie sinora utilizzate, che non sono in grado di discriminare gli elementi cellulari patologici da quelli normali del tessuto nervoso con conseguente insorgenza di rilevanti effetti collaterali. Accanto a questo ultimo aspetto, legato alla tossicità della terapia, vi è poi l'opportunità di sfruttare la selettività della terapia genica per colpire le cellule tumorali che si trovino ad infiltrare il tessuto nervoso normale e che attualmente sono impossibili da identificare, pur essendo ritenute alla base della insorgenza delle recidive dopo terapia. La scelta del vettore idoneo è dunque cruciale nella definizione degli standard di una terapia genica efficace.

Vettori virali

Limitandoci ad esaminare quanto pertiene alla ricerca sui gliomi maligni si nota come, nei modelli in vivo, l'utilizzo dei virus come vettori di materiale genico sia stato il primo ad essere preso in considerazione. I virus sono infatti dei veicoli ideali in quanto sono in grado di distribuirsi facilmente all'interno dell'organismo ospite, di superare la barriera ematoencefalica e di promuovere l'espressione del materiale genetico in essi contenuto utilizzando le strutture cellulari a questo deputate. È inoltre possibile intervenire con metodiche di ingegneria genetica a modificare il genoma virale in modo da renderlo adatto alle esigenze terapeutiche che intendiamo perseguire. Ad onor del vero, le prime ricerche in merito all'utilizzo dei virus nella terapia antineoplastica prevedevano l'utilizzo dei virus oncolitici, sfruttando la proprietà naturale di tali microorganismi di infettare le cellule dell'organismo ospite e di provocarne la lisi. L'intervento esterno sul genoma virale si limitava a rendere la replicazione virale e la conseguente lisi cellulare dipendenti dallo stato neoplastico delle cellule dell'ospite. Le esperienze accumulate hanno confermato sia la possibilità di utilizzare i virus nella terapia sperimentale dei gliomi, con minima tossicità per i pazienti, sia la possibilità di intervenire sul genoma virale apportando le modifiche desiderate. Questi due elementi sono fondamentali nell'applicazione dei vettori virali alla terapia genica.

Nel caso specifico dei virus oncolitici, nelle prime esperienze, la manipolazione genica del virus herpes simplex (HSV) prevedeva la delezione del gene codificante l'enzima timidin-chinasi (TK) che oltre ad essere necessario per la replicazione del DNA virale è anche il bersaglio della terapia antivirale con aciclovir. Sebbene la TK cellulare necessaria alla replicazione virale fosse particolarmente concentrata in cellule dell'organismo ospite in condizioni di proliferazione, favorendo la replicazione del virus all'interno di cellule di glioma piuttosto che nel restante tessuto nervoso, tale terapia risultò particolarmente tossica ad alte dosi e comunque rischiosa per la sua natura irreversibile, mancando qualsiasi presidio in grado di interferire sulla replicazione virale a seguito dell'inoculazione (Martuza, Malick et al. 1991). I dati raccolti nell'ambito di questa ricerca hanno comunque consentito di procedere alla creazione di numerosi virus mutanti che avessero una maggiore efficacia e sicurezza. Tra i virus oncolitici sviluppati per il trattamento dei gliomi maligni, solo alcuni sono risultati tanto promettenti da essere stati impiegati nell'ambito di sperimentazioni cliniche di fase 1: due ceppi di virus herpes simplex – G207 e HSV1716 – (Markert, Medlock et al. 2000; Rampling, Cruickshank et al. 2000), due ceppi di adenovirus a replicazione condizionata – Onyx-015 e Delta-24-RGD – (Fueyo, Gomez-Manzano et al. 2000; Fueyo, Alemany et al. 2003; Chiocca, Abbed et al. 2004) ed un reovirus – REOLYSIN, Oncolytics Biotech Inc, Calgary, Ontario, Canada – (Forsyth, Roldan et al. 2008).

Gli **HSV** sono un veicolo interessante soprattutto in virtù del loro genoma di cospicue dimensioni (>150 kb) che consente la sostituzione di circa 30 kb senza che questo interferisca con le caratteristiche salienti del microorganismo.

Nel HSV mutante G207, il genoma è stato modificato in modo da ottenere la delezione delle due copie del gene $\gamma_134.5$ e l'inserzione del gene *LACZ* nel locus *U_L39* (Mineta, Rabkin et al. 1995). Il gene $\gamma_134.5$ è necessario per favorire la sintesi proteica da parte della cellula ospite a seguito della iniziale replicazione virale. In sua assenza solo le cellule in cui il meccanismo di controllo della sintesi

proteica sia difettoso consentono comunque la traduzione, evento che si è osservato nei casi in cui vi sia una iperespressione di *RAS* (Farassati, Yang et al. 2001) ed alterazioni a livello di altri sistemi di segnale cellulare (Chou and Roizman 1992) tipici delle cellule neoplastiche. Il locus genico *UL39*, invece, è responsabile della produzione di una subunità dell'enzima ribonucleotide reductasi, essenziale per la replicazione virale. Tale enzima non è presente in cellule allo stato post-mitotico (Goldstein and Weller 1988), quali la maggior parte degli elementi costituenti il tessuto nervoso normale, mentre si ritrova in condizioni di proliferazione neoplastica (Goldstein and Weller 1988). Pertanto, la proliferazione del virus G207 è possibile solo a livello di cellule neoplastiche, inoltre, mantenendo la normale funzionalità dell'enzima TK, questo microorganismo rimane sensibile alle comuni terapie antivirali. Il trattamento con questo vettore non ha messo in evidenza particolari effetti tossici sebbene richiedesse l'effettuazione di iniezioni multiple intracerebrali.

HSV1716 è un HSV modificato che è stato sviluppato in Scozia ed è caratterizzato dalla delezione in omozigosi del gene $\gamma_134.5$, sebbene conservi la normale funzionalità di *UL39* (MacLean, ul-Fareed et al. 1991). È attualmente in corso una sperimentazione clinica di fase III che potrebbe consentirne la commercializzazione in tempi relativamente brevi per il trattamento di pazienti affetti da recidive di GBM già trattate con resezione chirurgica e radioterapia.

L'utilizzo degli **adenovirus**, come vettori di transgeni, è appetibile per il fatto che generalmente questi virus non sono responsabili di patologie particolarmente gravi e pertanto mostrano, dal punto di vista teorico, un buon profilo di tossicità.

ONYX-015 è un adenovirus modificato a replicazione condizionata (Heise, Sampson-Johannes et al. 1997). La delezione di *E1B-55K* consente la replicazione solo nelle cellule che abbiano un danno a livello di *p53*. Infatti, in condizioni normali, *E1B-55K* si lega a *p53* prevenendo l'insorgenza di apoptosi e consentendo la replicazione virale (Jiang, McCormick et al. 2006). L'esperienza

clinica ha messo in evidenza una buona tollerabilità di questo virus sebbene non siano stati osservati risultati clinici particolarmente brillanti, probabilmente per l'eterogeneità dell'espressione di *p53* nei GBM (Chiocca, Abbed et al. 2004).

Delta-24-RGD è un adenovirus modificato in cui la delezione di *E1A* consente la replicazione solo nelle cellule in cui vi sia un difetto a livello di *RB* e in cui le proteine di superficie sono state modificate al fine di favorire l'adsorbimento alle cellule neoplastiche. In condizioni fisiologiche *E1A* interagisce con *RB* disattivandolo e provocando la progressione del ciclo cellulare, l'espressione del DNA virale e la conseguente lisi cellulare. Pertanto, il virus Delta-24-RGD può provocare la lisi cellulare solo se *RB* è difettoso, come accade tipicamente nelle cellule neoplastiche (Jiang and Fueyo 2010).

Similmente a quanto osservato per gli adenovirus, anche per i **reovirus** (Reolysin™) vale il principio secondo il quale, non essendo associati a forme cliniche gravi, potrebbero essere impiegati nella terapia oncolitica umana senza particolari problemi. Inoltre, i reovirus mostrano un particolare tropismo per le cellule in cui il controllo della sintesi proteica sia difettoso, specialmente in associazione con l'iperespressione di *RAS* e delle vie di segnale cellulare ad esso collegate, comunemente osservata in cellule di GBM.

Le modifiche genetiche apportate ai virus oncolitici citati avevano lo scopo precipuo di renderli ultrasensibili per le cellule tumorali, lasciando alla loro fisiologica azione di lisi cellulare il compito di provocare la citoreduzione del tessuto neoplastico.

Più recentemente, sono state messe a punto metodiche di terapia genica vera e propria, con trasferimento all'interno delle cellule neoplastiche di geni terapeutici, che utilizzano vettori virali privati della loro capacità replicativa (Chiocca 2003; Germano, Fable et al. 2003). Tra questi hanno assunto una grande popolarità gli adenovirus, gli herpes virus ed i retrovirus.

Gli **adenovirus** sono vettori molto maneggevoli per i quali esiste una ampia esperienza sia in laboratorio che proveniente da studi clinici. Essi sono in grado di infettare una gran varietà di cellule, esprimendo il transgene che contengono indipendentemente dalla fase del ciclo cellulare in cui si trovi la cellula ospite. Il genoma non viene integrato nella cellula ospite e pertanto non vi sono rischi connessi con l'insorgenza di mutazioni inserzionali potenzialmente oncogeniche. La limitata capacità genetica è stata migliorata nei vettori adenovirali più recenti, consentendo il trasporto di geni di dimensioni pari a circa 30kb.

Gli **herpes virus** mostrano caratteristiche simili a quelle degli adenovirus. La loro proprietà di contenere transgeni di grandi dimensioni, sino a circa 150 kb, è controbilanciata dalla loro potenziale tossicità, nell'eventualità in cui dovesse ricostituirsi un ceppo virale neurotossico per fenomeni di ricombinazione. Naturalmente questo svantaggio è soprattutto teorico, dato che i moderni vettori basati su HSV sono risultati molto sicuri e la probabilità di ricombinazione è estremamente bassa.

I **retrovirus** sono dei vettori interessanti di transgeni per diversi motivi: anzitutto per la loro caratteristica di integrare il genoma virale all'interno di quello della cellula ospite, che presuppone almeno una mitosi da parte della stessa, ed in secondo luogo per la loro maneggevolezza. Inoltre, l'utilizzo di retrovirus dotati di capacità replicativa ha consentito di raggiungere livelli di trasduzione genica del 97% (Wang, Tai et al. 2003). Tuttavia, i loro elementi distintivi corrispondono anche ai loro limiti, per la possibilità concreta che si verifichino fenomeni di mutagenesi inserzionale a potenziale oncogenico. Inoltre, essendo particolarmente delicati, affinché l'inoculazione virale sia efficace è spesso necessario ricorrere all'utilizzo di vettori cellulari, generalmente fibroblasti murini, per somministrare il virus terapeutico (Rainov and Ren 2003). Recentemente è stato anche proposto l'utilizzo di HSV o adenovirus come vettori di genoma retrovirale, eludendo la necessità di utilizzare un veicolo cellulare (Hampl, Camp et al. 2003).

Due problemi, comuni ai vari vettori descritti, sono la bassa produzione di transgene e la scarsa diffusione del vettore nell'ambito delle masse neoplastiche. Per quanto riguarda il primo aspetto, i dati a disposizione hanno mostrato una bassa efficienza di trasfezione da parte dei vettori virali con percentuali variabili nelle varie casistiche e comprese tra 0.002% e 4% (Puumalainen, Vapalahti et al. 1998; Long, Lu et al. 1999; Harsh, Deisboeck et al. 2000). I retrovirus di ultima generazione sono risultati più efficaci da questo punto di vista, con una percentuale di trasfezione pari a circa 10%, simile a quella ottenuta recentemente mediante la somministrazione di sospensioni virali ad alta concentrazione, senza l'utilizzo di cellule vettore (Lee, Song et al. 2001; Tamura, Tamura et al. 2001). Oltre ad una oggettiva difficoltà legata ai meccanismi responsabili dell'espressione genica, un fattore di grande rilievo per l'efficacia della trasfezione è la penetrazione del vettore virale nell'ambito della neoplasia. Sono stati riportati i casi dei retrovirus, che infettano il tessuto neoplastico solo per alcune centinaia di micron attorno al punto di inoculo, e degli adenovirus, che diffondono per circa 5 mm (Lang, Bruner et al. 2003; Rainov and Ren 2003). Come si può intuire, questi dati non sono incoraggianti poichè in un ipotetico scenario clinico presuppongono la necessità di inoculazioni multiple all'interno della neoplasia, ripetute nel tempo per la facile esauribilità dell'espressione del transgene. Nel tentativo di migliorare la diffusione dei vettori virali nel contesto delle neoplasie si è tentato di modificare le proteine espresse sulla superficie virale al fine di facilitare l'adsorbimento alle cellule dell'ospite. Tuttavia, almeno per quanto è emerso sugli adenovirus, questo non ha comportato una maggiore efficacia della trasfezione, probabilmente per l'intervento di altri fattori concomitanti legati alla neoplasia. In proposito sta emergendo progressivamente l'importanza delle cellule stromali circostanti la neoplasia, della composizione della matrice extracellulare e dell'architettura tridimensionale dei diversi citotipi che costituiscono la massa tumorale (Paul, Everts et al. 2008). Una seconda strada che è stata tentata è quella di inserire, tra i transgeni veicolati all'interno

delle cellule neoplastiche, quelli codificanti per le proteine di membrana che costituiscono i canali intercellulari. Basti ricordare il caso emblematico di un vettore basato su HSV che, oltre a contenere il transgene *TK*, veicola i geni *TNF- α* , *ICP-0* e *CX43* (Niranjan, Wolfe et al. 2003). Mentre il primo è implicato nell'induzione dell'apoptosi ed il secondo agisce bloccando la sintesi proteica della cellula ospite a favore della trascrizione dei geni virali, antagonizzando l'effetto del IFN, il terzo corrisponde alla connessina 43, una proteina di membrana che costituisce le gap junctions. L'espressione di quest'ultima proteina sarebbe responsabile di un effetto attualmente molto studiato in campo oncologico, detto bystander effect, che consiste nella propagazione di un effetto antitumorale alle cellule vicine a quella bersaglio, probabilmente per la diffusione intercellulare di mediatori chimici determinanti. Altri meccanismi alla base del fenomeno del bystander effect sembrerebbero essere: la contestuale compromissione della vascolarizzazione del tumore e l'amplificazione della risposta immunitaria verso le cellule neoplastiche, per l'esposizione di antigeni a seguito della lisi di una piccola porzione di esse (Freeman, Abboud et al. 1993; Floeth, Shand et al. 2001).

Sebbene sia stato dimostrato che una trasfezione pari al 10% sia sufficiente a determinare degli effetti clinici apprezzabili (Sandmair, Turunen et al. 2000), rimane il problema di raggiungere tale livello di trasfezione e, soprattutto, di diffondere il vettore virale in modo omogeneo all'interno della neoplasia.

Questo problema è talmente pressante che si è anche tentato di utilizzare i virus oncolitici a capacità replicativa, già descritti per la loro azione diretta sulle cellule neoplastiche, come vettori di transgeni (Lawler, Peruzzi et al. 2006). Tra questi ricordiamo Ad5CMV ingegnerizzato con il transgene *p53*, Delta-24 ingegnerizzato sia con *p53* che con *TK* ed infine HSV ingegnerizzato con il gene della metalloproteinasi-3 (Hakkarainen, Hemminki et al. 2006; Mitlianga, Sioka et al. 2006; Mahller, Vaikunth et al. 2008).

Nonostante i progressi compiuti, i vettori virali sono ancora oggi ben lontani dal rappresentare un metodo efficace di trasferimento di transgeni nel tessuto neoplastico. La potenziale risposta immunitaria dell'ospite verso i vettori utilizzati, la possibilità di un inserimento inappropriato del transgene nel DNA ospite, la difficile trasposizione sull'uomo dei risultati ottenuti in laboratorio per la ben nota caratteristica di specie-specificità dei virus, la difficoltà ad ottenere una espressione genica prolungata se non a fronte di una integrazione del transgene nel DNA ospite e, infine, la difficoltà ad ottenere una trasfezione efficace sono solo le principali limitazioni che tali veicoli presentano (Germano and Binello 2009).

Mezzi chimico-fisici

Accanto all'utilizzo dei virus si è sviluppato un ambito di ricerca che prevede l'utilizzo di mezzi fisici e chimici per favorire la trasduzione di un gene di interesse all'interno delle cellule tumorali (Voges, Reszka et al. 2003; Kingsley, Dou et al. 2006; Zarnitsyn, Kamaev et al. 2007). Tra questi ricordiamo l'elettroporazione, i liposomi e l'utilizzo degli ultrasuoni. L'elettroporazione prevede l'esposizione delle cellule ad un campo elettrico che consenta di modificare la permeabilità della membrana cellulare e nucleare favorendo l'ingresso del transgene. L'utilizzo degli ultrasuoni si basa sostanzialmente sullo stesso principio ed è stato proposto anche in combinazione con altre modalità di trasferimento genico al fine di migliorarne l'efficienza. In ultimo, i liposomi offrono le migliori prospettive, considerata la fiorente ricerca nel campo delle nanotecnologie, ed è verosimile che possano rivestire un ruolo di primo piano nel futuro prossimo. Nonostante ciò le tecniche chimico-fisiche sono ancora troppo inefficienti per poter costituire una valida alternativa ai vettori virali (Germano and Binello 2009).

Vettori cellulari

Per ovviare alle limitazioni imposte dall'utilizzo dei vettori virali è stato proposto l'utilizzo di veicoli cellulari, in particolare di **cellule staminali**. Questi elementi

cellulari mostrano delle caratteristiche estremamente interessanti nell'ottica di una loro applicazione al campo della terapia genica. In particolare, l'isolamento e la possibilità di mantenimento in coltura delle cellule staminali embrionali umane, descritto nel 1998, ha aperto degli scenari prima impensabili nel campo della medicina (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998).

La nomenclatura generalmente utilizzata nel riferimento agli elementi staminali è spesso viziata da generalizzazioni che rischiano di causare una notevole confusione. Le cellule staminali embrionali sono caratterizzate da un diverso comportamento biologico, a seconda della fase di sviluppo e della sede di prelievo dall'embrione (Jaenisch and Young 2008). Se è vero che gli elementi caratterizzanti delle cellule staminali devono essere la capacità di proliferazione virtualmente illimitata nel tempo allo stato indifferenziato ed il mantenimento della totipotenza anche dopo lunghi periodi di coltura, tuttavia è necessario fare alcune precisazioni. Anzitutto, quando si parla di **cellule staminali embrionali** si intende che queste siano state ottenute da embrioni. Nell'ambito dello sviluppo embrionale gli unici elementi staminali dotati di *totipotenza* sono lo zigote ed i blastomeri derivati dalle prime divisioni mitotiche del primo. Già a partire dallo stadio di morula, per proseguire verso quello di blastocisti la totipotenza viene meno per lasciare spazio alla *pluripotenza*. Infatti, alcune cellule saranno responsabili della formazione del corpo embrionale mentre altre degli annessi derivati dal trofoblasto. Questa prima precisazione è necessaria poichè generalmente sono proprio le cellule della massa interna della blastocisti ad essere utilizzate per l'isolamento degli elementi staminali embrionali. Anche se tali cellule sono in grado di differenziare in qualsiasi elemento cellulare presente nell'organismo adulto, tuttavia mostrano un potenziale differenziativo inferiore a quello delle cellule totipotenti. A seguire vi saranno cellule staminali *multipotenti*, ovvero che sono già state indirizzate verso una linea differenziativa specifica. Queste sono anche chiamate **cellule staminali adulte**, poichè possono anche essere ottenute dai tessuti di un organismo adulto, permanendo un certo

pool cellulare necessario alle esigenze di rimodellamento e riparazione del danno in vari distretti corporei. Sebbene in passato si ritenesse che le cellule staminali multipotenti non potessero in alcun modo differenziarsi in cellule appartenenti ad altre linee differenziative, è stato descritto che questo fenomeno possa avere luogo, sebbene sia ancora discussa la possibilità che alla base ci siano fenomeni di mimetismo o di fusione cellulare (Willenbring and Grompe 2003; Brignier and Gewirtz 2010). In questi casi di transdifferenziazione è possibile che cellule appartenenti ad una linea differenziativa (ad esempio mesodermica) possano trasformarsi, in particolari condizioni di coltura, in elementi cellulari di una linea differenziativa diversa (ad esempio neuroectodermica) (Mezey, Chandross et al. 2000; Anderson, Gage et al. 2001; Krause, Theise et al. 2001). Ad espandere ulteriormente il campo delle cellule cosiddette staminali vi è poi il recente successo di vari gruppi di ricerca nel campo della riprogrammazione nucleare (Takahashi and Yamanaka 2006; Yu, Vodyanik et al. 2007; Jaenisch and Young 2008). Grazie a queste tecniche di trasferimento nucleare, fusione cellulare, manipolazione genetica e condizionamento in coltura, è possibile ottenere cellule con caratteristiche di staminalità a partire da cellule adulte completamente differenziate. A questo ultimo gruppo di cellule staminali si è dato il nome di **cellule pluripotenti indotte**.

Sebbene le cellule staminali di vario tipo offrano a considerare degli elementi caratteristici comuni dal punto di vista della espressione di marcatori cosiddetti di staminalità, tuttavia esistono delle differenze nel loro comportamento che non sono attualmente desumibili da alcuna analisi morfofunzionale. Solo l'osservazione del comportamento cellulare in varie condizioni di coltura consente di osservare le differenti potenzialità di cellule altrimenti indistinguibili. Pertanto, l'espressione dei marcatori di staminalità, tra cui ricordiamo Oct4, NANOG, SOX2 ed una marcata espressione di telomerasi, non costituisce una prova incontrovertibile delle potenzialità differenziative della cellula che li esprima. Questo aspetto è rilevante poichè la documentazione dei fenomeni di

riprogrammazione nucleare e di transdifferenziazione si basa proprio sull'espressione di marcatori di staminalità o di differenziazione. Sono state osservate delle evidenti differenze tra le vere cellule staminali embrionali pluripotenti, quelle multipotenti e quelle pluripotenti indotte. Tali differenze si manifestano, in condizioni di coltura, a vantaggio delle cellule staminali embrionali pluripotenti e consistono: in una più o meno rapida proliferazione cellulare, in una variabile difficoltà a mantenere le cellule in coltura ed infine in una più o meno agevole induzione del processo differenziativo (Donovan and Gearhart 2001; Brignier and Gewirtz 2010). Un ambito in cui tali differenze sono particolarmente evidenti è inoltre quello della manipolazione genica. In un primo momento, solo le staminali embrionali pluripotenti parevano essere suscettibili di ingegnerizzazione attraverso il meccanismo della ricombinazione omologa. È questa una tecnica che ha rivoluzionato la scienza consentendo l'inserimento estremamente preciso di un determinato gene in un sito specifico del DNA ospite (Thomas and Capecchi 1987). La tecnologia della ricombinazione omologa risolve le problematiche legate all'insorgenza della mutagenesi inserzionale, alla variabilità dell'espressione del transgene ed alla necessità di utilizzare vettori virali, che caratterizzavano le tecniche di ingegneria genetica prima del suo avvento. La ricombinazione omologa presenta ancora oggi delle difficoltà tecniche legate alla bassa frequenza di ricombinazione (inferiore a 10^{-6}) ottenibile nell'uomo (Thomas and Capecchi 1987; Zou, Maeder et al. 2009). Recentemente sono state descritte varianti metodologiche che consentono di aumentare di circa 1.400 volte l'efficienza della procedura raggiungendo percentuali di trasduzione del gene comprese tra 0,14% e 0,24% (Mitsui, Suzuki et al. 2009).

Nel corso degli anni, la ricombinazione omologa è stata ottenuta dapprima nelle cellule staminali embrionali pluripotenti umane ed in seguito anche in cellule staminali pluripotenti indotte (Mitsui, Suzuki et al. 2009; Zou, Maeder et al. 2009). Tuttavia, va considerato che esiste tutt'ora una maggiore difficoltà ad

effettuare con successo la ricombinazione omologa in elementi cellulari non derivati da embrioni. Naturalmente questo non significa che il ricorso alle staminali embrionali sia indispensabile o che lo sarà in futuro, in questo momento storico è comunque un dato di fatto che tali linee cellulari costituiscano ancora il punto di riferimento per qualsiasi altra staminale che venga studiata. Provocatoriamente si potrebbe comunque osservare, a ridimensionare le certezze di quanti si cimentino in modo fazioso nella difesa dell'utilizzo di una linea cellulare rispetto ad un'altra, che molti dei dati in nostro possesso derivano da studi compiuti su mammiferi non primati. La definizione stessa di cellula staminale embrionale pluripotente umana, ricavata da blastocisti preimpianto e capace di intraprendere qualsiasi linea differenziativa, si basa su una presunzione di identità con quelle di altri mammiferi. Infatti la prova definitiva della pluripotenza della cellula in questione potrebbe provenire solo dalla generazione di chimere in vitro e dal ritrovamento, a livello della serie germinale, di cellule derivate da quelle inizialmente trapiantate. Come ben si capisce, questo tipo di esperimento non potrà mai essere compiuto sull'uomo per motivi etici. Nonostante questo, esistono evidenze sia in mammiferi non primati che primati del fatto che siamo realmente in possesso di elementi staminali pluripotenti e che questi mostrino delle caratteristiche superiori a quelle degli altri elementi staminali ottenuti da tessuti adulti. Cionondimeno, è auspicabile che la ricerca in merito possa procedere in parallelo per poter chiarire i meccanismi alla base delle differenze ancora oggi osservate, al fine di poterle eventualmente eliminare e di avere a disposizione uno strumento di terapia cellulare e genica che sia condivisibile dal maggior numero di individui possibile, nel rispetto delle reciproche convinzioni etiche.

Il vantaggio che le cellule staminali offrono, come vettori di terapia genica, risiede nel fatto che esse possono essere permanentemente modificate geneticamente in vitro tramite la ricombinazione omologa e moltiplicate indefinitamente. Pertanto, si realizza la possibilità teorica di avere a disposizione

una riserva pressochè illimitata di cellule transgeniche che, a loro volta, potranno essere differenziate in qualsiasi tipo cellulare di interesse, mantenendo la capacità di esprimere il transgene in questione. Inoltre, la manipolazione genica degli elementi staminali consentirebbe di generare una moltitudine di linee cellulari con caratteristiche antigeniche tali da poter essere compatibili con i sistemi maggiori di istocompatibilità, consentendo il loro impiego clinico ed eludendo i problemi connessi con il rigetto da parte dell'ospite (Germano and Binello 2009).

In realtà, anche le cellule multipotenti, specialmente di natura mesenchimale e neurale, sono state utilizzate come veicoli di transgeni (Nakamura, Ito et al. 2004; Menon, Kelly et al. 2009; Balyasnikova, Ferguson et al. 2010; Dasari, Kaur et al. 2010; Gu, Li et al. 2010; Gunnarsson, Bexell et al. 2010). I sostenitori del loro utilizzo hanno sottolineato la possibilità di ottenere tali elementi cellulari direttamente dai tessuti del paziente e di sottoporre gli elementi staminali isolati a manipolazioni genetiche, che li rendano utili alla espressione di transgeni una volta reimpiantate sul donatore. Questo tipo di approccio, però, ha delle carenze sul piano pratico. Le procedure necessarie al prelievo di elementi staminali multipotenti non è particolarmente complesso per alcuni elementi mesenchimali, che possono essere ritrovati a livello del midollo osseo o addirittura del tessuto adiposo, ma il discorso diviene decisamente più complesso nel caso di elementi neurali, per la necessità di procedere all'esecuzione di una biopsia di tessuto nervoso in regioni piuttosto profonde dell'encefalo. Le cellule multipotenti neurali sono infatti state isolate a livello delle regioni periventricolari, del bulbo olfattivo e dell'ippocampo (Eriksson, Perfilieva et al. 1998). Una seconda limitazione dipende dall'estrema difficoltà ad effettuare la ricombinazione omologa in queste cellule e, pertanto, l'inserimento del transgene si basa ancora sull'utilizzo di metodiche fisico-chimiche quali l'esposizione delle cellule a ioni calcio, liposomi o campi elettrici (elettroporazione) oppure sull'impiego di vettori virali. Naturalmente

l'impossibilità di controllare in modo preciso il sito di inserzione della sequenza genica desiderata pone gli stessi problemi che insorgono con l'utilizzo di vettori virali. Infine, è verosimile che le procedure di isolamento della linea cellulare desiderata e della sua espansione, sino ad ottenere un pool cellulare sufficiente all'impiego clinico, risultino particolarmente complesse.

L'impiego diretto delle cellule staminali, di qualsiasi natura, come vettori di transgeni mostra tuttavia delle problematiche di un certo rilievo. La pluripotenza è infatti un limite all'utilizzo di cellule indifferenziate. È noto che l'impianto di tali elementi cellulari in un organismo ospite esiti nella formazione di un teratoma, ovvero di una massa neoplastica in cui accanto ad elementi indifferenziati si osservino aree di differenziazione in tessuti appartenenti ai tre foglietti embrionali (Asano, Ageyama et al. 2003; Erdo, Buhle et al. 2003; Wakitani, Takaoka et al. 2003). Se questo inconveniente preclude l'utilizzo diretto di cellule indifferenziate, tuttavia, la possibilità di procedere in vitro alla differenziazione delle cellule staminali transgeniche fornisce una possibile soluzione a questo problema (Benveniste, Keller et al. 2005; Uzzaman, Benveniste et al. 2005).

Pertanto, la differenziazione di elementi cellulari stabili a partire da staminali embrionali pluripotenti transgeniche pare essere ancora il metodo più sicuro per ottenere una espressione genica affidabile. Per quanto riguarda la terapia del GBM, la differenziazione di astrociti transgenici è sicuramente molto intrigante sotto diversi aspetti. Contrariamente a quanto osservato nelle staminali multipotenti neurali, gli astrociti non possono differenziare ulteriormente e non presentano il rischio di generare elementi cellulari neuronali che potrebbero interferire con la circuiteria del tessuto ospite. Gli astrociti sono inoltre cellule normalmente presenti nel sistema nervoso centrale, ove svolgono una funzione trofica e di supporto metabolico per i neuroni. Dati recenti hanno evidenziato la possibilità che, accanto alle reti neuronali, sia presente una vera e propria rete astrocitaria, che abbia delicati compiti metabolici e che intervenga ad assicurare la normale funzione del tessuto nervoso (Giaume, Koulakoff et al. 2010). Gli

astrociti mostrano altresì una spiccata capacità secretiva e sono in grado di migrare all'interno del sistema nervoso centrale, seguendo vie preferenziali lungo i fasci di sostanza bianca. Altra caratteristica, che li rende particolarmente adatti ad essere utilizzati come veicoli di terapia genica, è la loro capacità di esprimere condizionalmente transgeni (Roth, Isenmann et al. 1999; Zhu, Zheng et al. 2002; Saito, Bringas et al. 2004; Benveniste, Keller et al. 2005; Germano, Uzzaman et al. 2006). Esistono, inoltre, esperienze che riportano la capacità degli astrociti derivati da cellule staminali embrionali di migrare verso siti patologici del sistema nervoso centrale, ivi compresi i GBM. Questa capacità potrebbe essere correlata con la produzione di segnali cellulari, sia da parte delle cellule neoplastiche che delle cellule stromali coinvolte nel rimodellamento della matrice extracellulare (Aboody, Brown et al. 2000; Imitola, Raddassi et al. 2004). Gli astrociti sarebbero in grado di migrare attraverso il tessuto nervoso, probabilmente anche grazie alla produzione di metalloproteasi (Ries, Egea et al. 2007), raggiungendo le singole cellule neoplastiche infiltranti, che sono considerate alla base dell'insorgenza delle recidive di malattia dopo asportazione chirurgica macroscopicamente radicale.

Geni terapeutici

La scelta del transgene da utilizzare nella terapia del GBM deriva, come detto, dalle caratteristiche delle cellule neoplastiche. Senza entrare nei minimi dettagli delle varie esperienze presenti in letteratura basti citare la possibilità di utilizzare diverse classi di transgeni nelle terapie sperimentali dei gliomi, indipendentemente dal tipo di vettore utilizzato (Fig. 10). Sono stati testati geni suicidi, geni che modulano l'intervento del sistema immunitario nei confronti della neoplasia e geni che interferiscono con le vie di segnale che presentano alterazioni nelle cellule neoplastiche (Chiocca 2003; Lawler, Peruzzi et al. 2006; Germano and Binello 2009).

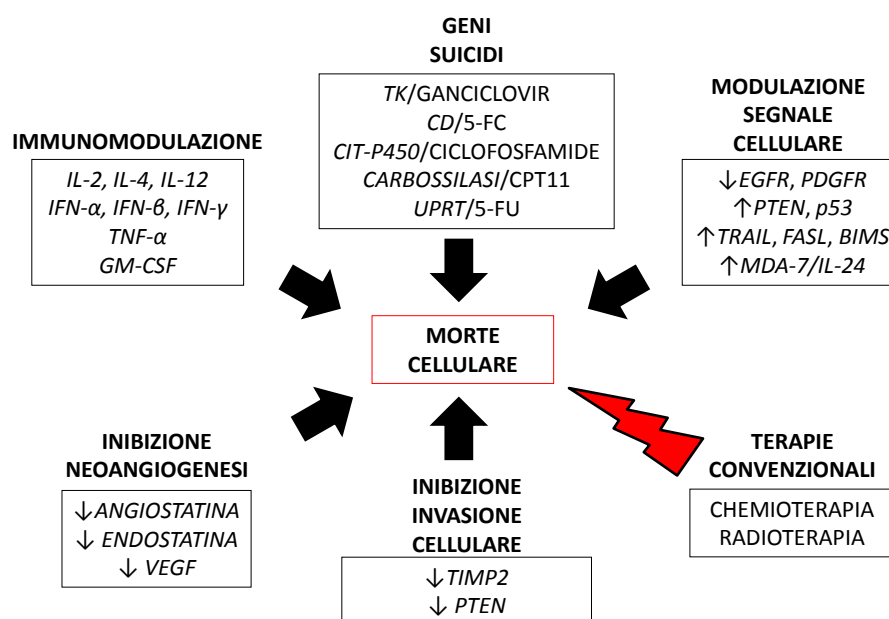


Fig. 10: Approcci di terapia genica descritti per la terapia sperimentale del GBM. Tutte le strategie indicate sono considerate adiuvanti e sensibilizzano le cellule neoplastiche all'azione delle terapie standard.

I **geni suicidi** si basano sul principio di concentrare la tossicità dei farmaci antineoplastici solo a livello delle cellule tumorali. In sostanza, si tratta di geni che, una volta espressi dalle cellule neoplastiche, sono in grado di convertire un profarmaco, altrimenti privo di attività biologica, in un principio attivo citotossico. Naturalmente, l'espressione selettiva del gene suicida da parte delle cellule tumorali consente di concentrare la tossicità selettivamente su di esse. La più vasta esperienza con questo tipo di approccio deriva dall'utilizzo del gene *TK*, associato alla somministrazione di ganciclovir (Nestler, Wakimoto et al. 2004). Sono inoltre state descritte altre coppie di gene-profarmaco quali ad esempio citosina deaminasi (CD) e 5 fluorocitosina (5-FC), citocromo P450 e ciclofosfamide, carbossilasi e CPT11, uracile fosforibosiltrasferasi (UPRT) e 5-fosfouracile (5-FU) (Lawler, Peruzzi et al. 2006).

La **modulazione della risposta immunitaria** è una strategia particolarmente attraente poichè offre l'opportunità di colpire in modo estremamente selettivo il

tumore (Ehtesham, Black et al. 2004; Okada and Pollack 2004). L'utilizzo della terapia genica, in questo ambito, offre degli indubbi vantaggi poichè la somministrazione sistemica di citochine immunomodulanti risulta molto complessa, sia per problematiche legate alla farmacocinetica che per gli effetti indesiderati a livello sistemico che queste provocherebbero. Sono stati descritti numerosissimi approcci differenti che si basano sull'utilizzo di interleuchine (IL-2, IL-4, IL-12), interferoni (IFN- α , IFN- β , IFN- γ), TNF- α ed il fattore stimolante i granulociti/macrofagi (GM-CSF) (Lawler, Peruzzi et al. 2006). L'utilizzo dei geni esprimenti le citochine può essere utilizzato in modo isolato al fine di stimolare la risposta immunitaria verso le cellule neoplastiche, ovvero essere impiegato in combinazione con altre strategie terapeutiche quali l'utilizzo di geni suicidi, la stimolazione delle cellule dendritiche al fine di ottenere la sensibilizzazione verso epitopi neoplastici e la radioterapia (Palu, Cavaggioni et al. 1999; Lumniczky, Desaknai et al. 2002; Ali, Curtin et al. 2004).

La **modulazione delle vie di segnale cellulare** coinvolte nell'oncogenesi del GBM offre delle interessantissime prospettive, sia per il gran numero di difetti molecolari suscettibili di correzione, che vengono ancora oggi scoperti per questa neoplasia, sia per la possibilità di colpire in parallelo diversi aspetti del metabolismo cellulare tumorale (Rao and James 2004). Sono stati descritti approcci terapeutici che vanno ad interferire con le vie di segnale anormali che sono responsabili della proliferazione incontrollata mediante l'inibizione delle cascate molecolari che fanno capo a EGFR e PDGFR (Lammering, Hewit et al. 2003). Una seconda modalità di intervento prevede l'espressione di geni oncosoppressori che vengono ad essere ipoespressi nei GBM quali *PTEN* e *p53* (McNeish, Bell et al. 2004). Anche l'espressione di geni proapoptotici è particolarmente promettente, con notevoli risultati riportati in vari modelli sperimentali. Tra i geni proapoptotici maggiormente sperimentati ricordiamo *TRAIL*, *FASL* e *BIMS* (Ehtesham, Kabos et al. 2002; Yamaguchi, Okada et al. 2003; Germano, Uzzaman et al. 2006). Un ulteriore possibilità è offerta dall'inibizione

dell'angiogenesi, sia attraverso la trasduzione di geni antiangiogenici che tramite l'inibizione di quelli proangiogenici. Tra i primi ricordiamo l'*angiostatina* e l'*endostatina* mentre dei secondi il più studiato e senza dubbio il *recettore VEGF* (Ma, Lin et al. 2002; Heidenreich, Machein et al. 2004; Ponnazhagan, Mahendra et al. 2004). Infine, vi sono recenti dati sull'utilità di contrastare l'espressione di molecole di invasione tramite l'utilizzo di transgeni quali l'inibitore della metalloproteasi 2 (*TIMP2*) e *PTEN* (Lu, Zhou et al. 2004).

Melanoma differentiation associated gene – 7 (MDA-7/IL-24)

Tra tutti gli approcci di terapia genica, è stato recentemente descritto quello con il *MDA-7/IL-24*, con interessanti prospettive di sviluppo anche nel campo dei GBM. *MDA-7/IL-24* (melanoma differentiation associated gene – 7) è un gene che è stato scoperto mediante metodica di ibridazione di sottrazione applicata all'induzione della differenziazione (Jiang, Lin et al. 1995). Tale gene fa parte della più ampia famiglia delle interleuchine, in particolare di *IL-10*, ed è codificato a livello del braccio lungo del cromosoma 1 (Huang, Madireddi et al. 2001; Mhashilkar, Schrock et al. 2001). Il suo isolamento è avvenuto per la prima volta in relazione allo stato di differenziazione mostrato dalle cellule di melanoma, con livelli di espressione massimi riscontrati a livello dei melanociti normali e dei nevi e livelli di espressione decrescenti in melanomi superficiali, profondi e metastatici (Jiang, Lin et al. 1995; Ellerhorst, Prieto et al. 2002). Il fatto che la sua espressione cellulare fosse correlata con una condizione di differenziazione ha fatto supporre che *MDA-7/IL-24* potesse avere degli effetti sulla proliferazione cellulare, che potessero essere sfruttati nella terapia dei tumori. Questa teoria è stata ampiamente confermata da una lunga serie di dati sperimentali ottenuti in svariate condizioni. La trasduzione del gene *MDA-7/IL-24* tramite vettori adenovirali non replicanti ha consentito di arrestare la crescita di cellule neoplastiche, di indurne la differenziazione e di provocarne la morte per apoptosi (Jiang, Lin et al. 1995; Su, Madireddi et al. 1998; Madireddi, Su et al.

2000; Saeki, Mhashilkar et al. 2000; Huang, Madireddi et al. 2001; Mhashilkar, Schrock et al. 2001; Su, Lebedeva et al. 2001; Lebedeva, Su et al. 2002; Saeki, Mhashilkar et al. 2002; Sarkar, Su et al. 2002; Lebedeva, Su et al. 2003; Sauane, Gopalkrishnan et al. 2003; Su, Lebedeva et al. 2003; Yacoub, Mitchell et al. 2003). L'induzione dell'apoptosi è stata ulteriormente studiata al fine di chiarire i meccanismi alla base della sua insorgenza. In particolare è stato documentato che essa è dovuta ad una modificazione del bilanciamento esistente tra mediatori proapoptotici (BAX), ed antiapoptotici (BCL2) a favore dei primi (Saeki, Mhashilkar et al. 2000; Lebedeva, Su et al. 2002; Lebedeva, Sarkar et al. 2003; Su, Lebedeva et al. 2003; Yacoub, Mitchell et al. 2003). È stata inoltre documentata l'attivazione della cascata delle caspasi (Saeki, Mhashilkar et al. 2000; Mhashilkar, Schrock et al. 2001; Pataer, Vorburger et al. 2002). Le proprietà antiproliferative e proapoptotiche di *MDA-7/IL-24* sono state confermate in numerose linee cellulari, derivate da lesioni neoplastiche, tra cui osteosarcoma, carcinoma mammario, carcinoma della cervice uterina, del colon e della prostata, mentre nessun effetto è stato dimostrato in cellule non tumorali quali fibroblasti, cellule dell'epitelio ghiandolare mammario ed astrociti (Jiang, Su et al. 1996; Su, Lebedeva et al. 2003). Il medesimo effetto antitumorale è stato descritto anche nei gliomi maligni (Jiang, Su et al. 1996; Madireddi, Su et al. 2000; Su, Lebedeva et al. 2003; Yacoub, Mitchell et al. 2003). Un'eccezione è rappresentata dalle cellule di carcinoma pancreatico in cui la trasfezione del gene non si accompagnava alla sintesi della relativa proteina. Tali cellule, tuttavia, divenivano sensibili al trattamento con *MDA-7/IL-24*, per il ripristino della sintesi proteica, a seguito della inibizione di K-RAS (Su, Lebedeva et al. 2001; Sarkar, Dent et al. 2008). Lo stesso paradigma è stato applicato anche ad altre linee cellulari neoplastiche, che hanno mostrato di poter essere sensibilizzate all'azione di *MDA-7/IL-24* a seguito della modulazione di specifiche cascate di segnale, come avviene ad esempio a seguito dell'inibizione di BCL2 (Eager, Harle et al. 2008; Sarkar, Dent et al. 2008). La selettività degli effetti di *MDA-7/IL-24*

non pare essere legata a differenze nel livello di espressione del transgene né della proteina prodotta (Mhashilkar, Schrock et al. 2001; Lebedeva, Su et al. 2002; Lebedeva, Sarkar et al. 2003; Su, Lebedeva et al. 2003). Il trattamento con *MDA-7/IL-24*, di lesioni neoplastiche successivamente impiantate in animali da esperimento, ha comportato una inibizione della crescita e della proliferazione cellulari (Su, Madireddi et al. 1998). La medesima azione antitumorale è stata confermata a seguito della trasduzione del gene mediante vettore adenovirale, privato della capacità replicativa, nel contesto di tumori già sviluppati in animali da esperimento (Madireddi, Su et al. 2000; Saeki, Mhashilkar et al. 2002). La terapia con *MDA-7/IL-24* è risultata essere significativamente superiore a quella con *p53* ed è indipendente dallo stato di *p53* nelle cellule neoplastiche (Su, Lebedeva et al. 2003). Sebbene in regime monoterapeutico *MDA-7/IL-24* non fosse in grado di controllare la malattia, nonostante l'induzione di apoptosi, la sua combinazione con radioterapia ha mostrato un effetto sinergico (Su, Lebedeva et al. 2003; Yacoub, Mitchell et al. 2003; Yacoub, Mitchell et al. 2003). La selettività degli effetti di *MDA-7/IL-24* è stata confermata anche negli studi clinici sinora effettuati, ove è stato dimostrato un ottimo indice terapeutico senza possibilità di individuare una dose tossica. Gli unici effetti indesiderati sembrerebbero legati alla presenza del vettore virale (Jiang, Lin et al. 1995; Su, Madireddi et al. 1998; Cunningham, Chada et al. 2005).

Nel tentativo di fare luce sui meccanismi antitumorali, sono stati condotti numerosi studi sulle vie di segnale cellulare che si modificano in seguito alla espressione di *MDA-7/IL-24*. La già nota induzione dell'apoptosi è integrata da una complicata serie di fenomeni cellulari (Fig. 11).

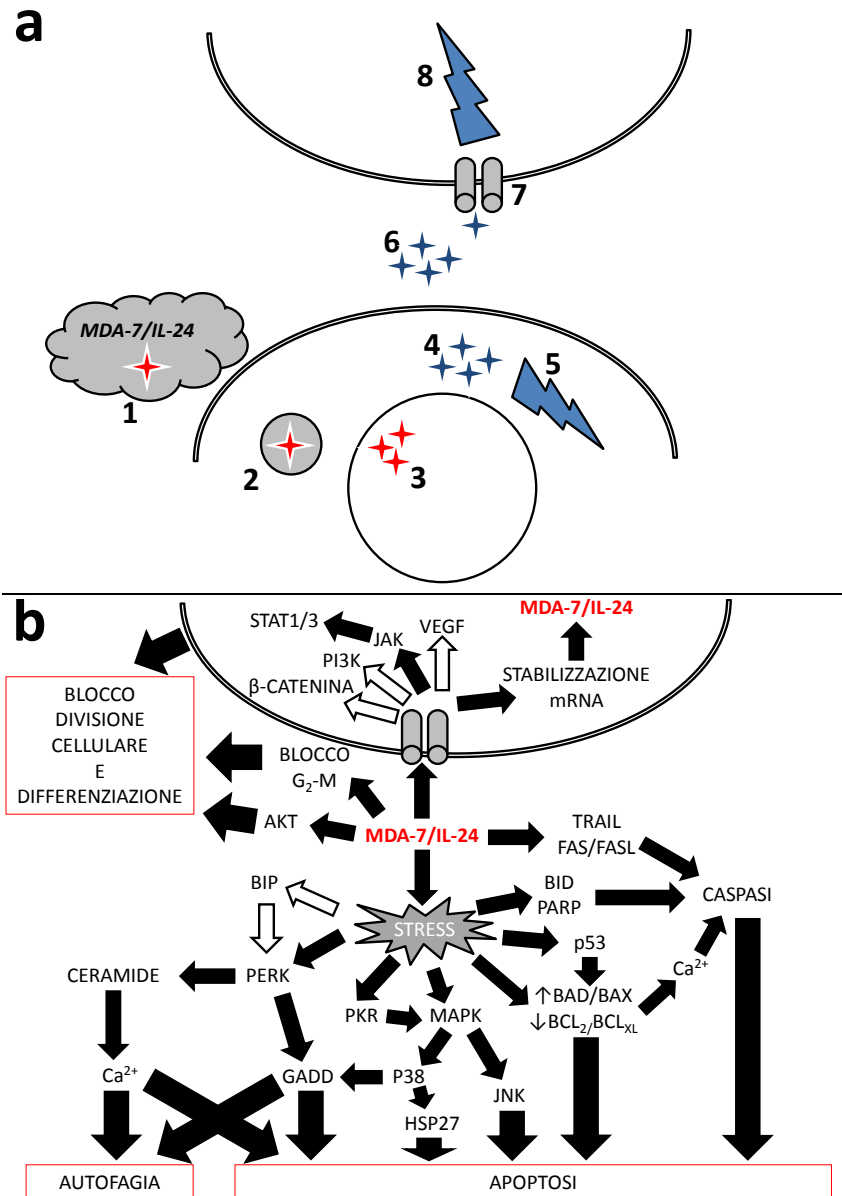


Fig. 11: (a) Il transgene *MDA-7/IL-24*, inserito in un adeguato vettore (1), viene trasdotto all'interno della cellula bersaglio (2). L'espressione del transgene (3) esita nella sintesi della corrispettiva proteina a livello citoplasmatico (4), ove svolge la sua azione antineoplastica (5). A seguito della secrezione nello spazio extracellulare (6), la proteina stimola i recettori di membrana delle cellule vicine (7), provocando i fenomeni cellulari alla base della sua azione antineoplastica (8). (b) Lo schema mostra gli effetti della proteina *MDA-7/IL-24* sul metabolismo delle cellule neoplastiche. Le azioni di *MDA-7/IL-24* sono sia dipendenti (parte alta della figura) che indipendenti (parte bassa della figura) dall'attivazione dei relativi recettori di membrana. La stimolazione dei recettori di membrana, oltre a modulare numerose vie di segnale, induce la produzione di proteina *MDA-7/IL-24* endogena. A livello citoplasmatico la proteina esplica un'azione sull'induzione della morte cellulare sia diretta che mediata dallo stress a livello del reticolo endoplasmatico. Le frecce bianche indicano un effetto inibitorio mentre quelle nere un effetto stimolatorio.

Si sono potuti osservare: il blocco della progressione del ciclo cellulare alla fase G₂-M (Saeki, Mhashilkar et al. 2000; Lebedeva, Su et al. 2002; Lebedeva, Sarkar et al. 2003; Su, Lebedeva et al. 2003; Yacoub, Mitchell et al. 2003), l'attivazione della cascata delle MAPK, in particolare di P38 (Sarkar, Su et al. 2002; Yacoub, Mitchell et al. 2003) che a sua volta attiva i geni della famiglia *GADD* (Sarkar, Su et al. 2002; Su, Lebedeva et al. 2003) che sono notoriamente implicati nella risposta al danno genetico, l'attivazione della cascata JAK/STAT (Dumoutier, Leemans et al. 2001; Kotenko 2002; Parrish-Novak, Xu et al. 2002; Gopalkrishnan, Sauane et al. 2004) nonché di PKR, una protein-chinasi RNA-dipendente coinvolta nelle risposte cellulari alle infezioni virali (Pataer, Vorburger et al. 2002). L'attivazione della cascata MAPK/P38 è inoltre responsabile dell'attivazione della proteina da shock termico HSP27, che è autonomamente capace di innescare l'apoptosi (Sarkar, Su et al. 2002). L'interferenza con i segnali di P38 e *GADD* riduce notevolmente, sino in certi casi ad annullare, gli effetti apoptotici di *MDA-7/IL-24* (Sarkar, Su et al. 2002). Sebbene il coinvolgimento di PKR sembri essere un evento a monte dell'attivazione di MAPK e P38, tuttavia MAPK e P38 paiono essere dei bersagli indipendenti di *MDA-7/IL-24* (Fisher, Gopalkrishnan et al. 2003). Esistono comunque evidenze dell'esistenza di un meccanismo proapoptotico indipendente da PKR (Chada, Mhashilkar et al. 2004; Chada, Sutton et al. 2004). Inoltre *MDA-7/IL-24* esplica un'azione inibitoria sulle cascate di segnale che fanno capo a PI3K e al sistema della β -catenina (Mhashilkar, Stewart et al. 2003). Oltre agli effetti proapoptotici descritti, sono stati segnalati effetti anche su TRAIL, FAS/FASL, BID e PARP, facendo postulare il reclutamento di risposte cellulari suggestive di un meccanismo apoptotico su base estrinseca, intrinseca e mista (Su, Madireddi et al. 1998; Su, Lebedeva et al. 2001; Lebedeva, Su et al. 2002; Saeki, Mhashilkar et al. 2002; Lebedeva, Sarkar et al. 2003; Ramesh, Mhashilkar et al. 2003; Gopalan, Litvak et al. 2005).

L'interferenza con un grande numero di vie di segnale cellulare, ed a diversi livelli nella stessa cascata di segnale, fa supporre che l'effetto proapoptotico di *MDA-7/IL-24* possa basarsi su meccanismi specifici in diverse cellule neoplastiche, a seconda delle caratteristiche biologiche che esse presentino (Sarkar, Su et al. 2002; Sauane, Gopalkrishnan et al. 2003). Inoltre, l'interferenza contestuale su diverse vie di segnale, implicate nell'insorgenza delle neoplasie, amplifica gli effetti terapeutici mostrati da *MDA-7/IL-24* (Hamed, Yacoub et al. 2010). Fattori che stimolino la produzione di radicali liberi, quali la radioterapia e l'arsenico, mostrano un'azione sinergica, ovvero superiore alla somma dei singoli effetti, con *MDA-7/IL-24* (Kawabe, Nishikawa et al. 2002; Su, Lebedeva et al. 2003; Yacoub, Mitchell et al. 2003; Yacoub, Mitchell et al. 2003; Yacoub, Mitchell et al. 2003; Yacoub, Hamed et al. 2008). Dal momento che uno degli effetti della radioterapia pare essere l'attivazione della via JNK è possibile che questa sia alla base degli effetti sinergici riscontrati (Kawabe, Nishikawa et al. 2002; Yacoub, Mitchell et al. 2003).

Un aspetto particolarmente interessante di *MDA-7/IL-24* è che gli effetti, osservati a seguito della trasduzione con vettore virale, risultano spropositati alla percentuale di cellule trasfettate. Questo fenomeno sembrerebbe legato alla capacità, da parte delle cellule che esprimono *MDA-7/IL-24*, di tradurre la corrispondente proteina e di secerneirla all'esterno amplificando l'effetto terapeutico, secondo il ben noto fenomeno del "bystander effect" (Dumoutier, Leemans et al. 2001; Gopalkrishnan, Sauane et al. 2004; Lebedeva, Emdad et al. 2007). A conferma della reale esistenza di questo fenomeno vi sono i dati relativi alle esperienze in vivo, laddove sono stati riscontrati livelli apprezzabili di *MDA-7/IL-24* a distanza di circa 1 cm dal punto di inoculo del vettore virale non replicante (Fisher, Gopalkrishnan et al. 2003). I primi studi in merito hanno suggerito che la proteina purificata (sMDA-7/sIL-24) avesse un'azione di tipo citostatico mentre la trasduzione del gene avesse un effetto citotossico (Parrish-Novak, Xu et al. 2002). Ulteriori studi hanno chiarito che sMDA-7/sIL-24 è un

inibitore della proliferazione cellulare in alcuni tipi di neoplasia (Parrish-Novak, Xu et al. 2002) mentre non mostra particolari attività in altri (Fisher, Gopalkrishnan et al. 2003). La dimostrazione conclusiva della reale esistenza del bystander effect risiede tuttavia nella descrizione dei recettori di membrana che mediano gli effetti di sMDA-7/sIL-24. Essi appartengono alla famiglia dei recettori per IL-20/IL-22 che sono in grado di attivare la cascata di segnale che coinvolge STAT1 e, soprattutto, STAT3 (Su, Emdad et al. 2005). Nel dettaglio, l'attività recettoriale sarebbe svolta da dimeri delle proteine di membrana: l'elemento di base sarebbe IL-20R2 accoppiato di volta in volta con IL-20R1 ed IL-22R1 (Dumoutier, Leemans et al. 2001; Wang, Tan et al. 2002). Alcuni gruppi di ricerca hanno comunque cercato di ridimensionare l'entusiasmo suscitato dalle proprietà di *MDA-7/IL-24* mettendo in dubbio i suoi effetti terapeutici. Secondo la stessa fonte, l'effetto antineoplastico del gene sarebbe da ascrivere esclusivamente all'utilizzo del vettore virale, che indurrebbe la produzione di IFN e di un maggior numero di recettori di membrana per IL-24, altrimenti assenti nella maggior parte delle cellule neoplastiche (Kreis, Philippidou et al. 2007).

Accanto all'attivazione di specifiche vie di segnale, mediata da meccanismi recettoriali, è stata descritta la possibilità di un effetto recettoriale piuttosto singolare. Tra gli effetti della proteina MDA-7/IL-24 è stata documentata un'azione sulla produzione endogena della stessa proteina. In realtà, si è chiarito trattarsi di un'azione stabilizzante il mRNA trascritto a partire dal gene *MDA-7/IL-24* endogeno, con conseguente aumento della concentrazione della proteina a livello citoplasmatico, ove svolge la maggior parte delle sue funzioni (Sauane, Su et al. 2008). Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti utilizzando GST-MDA-7/IL24, una forma della proteina accoppiata alla proteina di fusione GST purificata da colture di *Escherichia coli*. L'interazione di GST-MDA-7/IL-24 con i recettori di membrana provoca un aumento dell'espressione del gene costitutivo *MDA-7/IL-24* con induzione di apoptosi ed autofagia (Sauane, Gopalkrishnan et al. 2004; Sauane, Lebedeva et al. 2004). I fenomeni che causano la morte delle

cellule neoplastiche a seguito della somministrazione di GST-MDA-7, sono bloccati dall'utilizzo dell'antiossidante acetilcisteina, da inibitori di JNK (SP600125), da paninibitori delle caspasi (zVAD) e da inibitori selettivi della caspasi 9 (LEHD) ma non da inibitori selettivi della caspasi 8 (IETD). L'inibizione selettiva della caspasi 9 non interferisce con l'attività di JNK o di BAD e BAX ma provoca inibizione di BCL_{XL}, di MAPK, nonché del clivaggio della caspasi 3. D'altra parte, l'impiego di agenti antiossidanti inibisce le cascate di segnale che coinvolgono JNK ma non BAD e BAX, suggerendo un'azione diretta di MDA-7/IL-24, indipendente dalla via delle MAPK. Pertanto, vi sarebbe un'attivazione in parallelo di due vie apoptotiche, una dipendente ed una indipendente dalla produzione di stress ossidativo (Yacoub, Mitchell et al. 2004). Ulteriori ricerche hanno evidenziato che MDA-7/IL-24 si concentra, a livello intracellulare, prevalentemente nel reticolo endoplasmatico e che l'utilizzo di vettori virali con particolare tropismo per questo compartimento cellulare esalta gli effetti della proteina in questione, per l'induzione di stress ossidativo e della "unfolded protein response" a livello del reticolo endoplasmatico (Pataer, Hu et al. 2008). Questo fenomeno costituisce un meccanismo indipendente dalla presenza di recettori di membrana attraverso il quale si esplica l'azione antitumorale di MDA-7/IL-24, ma dipende dalla concentrazione intracellulare della medesima proteina. Recenti esperimenti hanno chiarito che la presenza della proteina MDA-7/IL-24 a livello del reticolo endoplasmatico causa l'attivazione di PERK che esita in un'attivazione di GADD. Allo stesso tempo, il già descritto coinvolgimento di BAK e BAX provoca il rilascio di Ca²⁺ dal reticolo endoplasmatico, con il risultato di provocare l'attivazione della cascata delle caspasi. In realtà l'attivazione di PERK provoca due fenomeni apparentemente paradossali. Se da un lato promuove l'attivazione delle vie apoptotiche descritte, dall'altro si osserva il reclutamento di mediatori legati all'insorgenza dell'autofagia (Park, Yacoub et al. 2008; Park, Zhang et al. 2008). È questo un meccanismo di sopravvivenza che consiste nella autodigestione di porzioni variabili della cellula,

nel tentativo di scongiurare l'incombente morte (de Bruin and Medema 2008; He and Klionsky 2009; Loos and Engelbrecht 2009). Mentre in un primo momento lo stress del reticolo endoplasmatico genera una risposta di adattamento cellulare, con il reclutamento di tutti i meccanismi autofagici ed antiapoptotici che possano assicurare la sopravvivenza, se la condizione di stress permane si assiste a fenomeni di morte cellulare sia per autofagia che per apoptosi. A questo riguardo è verosimile che il maggior stress ossidativo basale che caratterizza le cellule neoplastiche le predisponga ad una maggiore sensibilità nei confronti di MDA-7/IL-24, ponendo le basi per la selettività verso il tumore precedentemente descritta. È stato inoltre osservato che MDA-7/IL-24 induce un aumento dei livelli intracellulari di ceramide. Questo lipide possiede proprietà antitumorali ed è stato implicato nella mediazione e nella regolazione di numerosi processi cellulari, compreso l'arresto del ciclo cellulare, l'apoptosi, l'autofagia, la senescenza e la risposta allo stress ossidativo (Ogretmen and Hannun 2004; Park, Zhang et al. 2008). MDA-7/IL-24, associandosi a BIP, eliminerebbe l'inibizione esercitata da BIP su PERK provocando un aumento dei livelli di ceramide (Gupta, Walter et al. 2006). Questo lipide genera un aumento della concentrazione di Ca^{2+} , con conseguente aumento del livello dello stress cellulare ed induzione di autofagia (Park, Yacoub et al. 2008; Park, Walker et al. 2009; Yacoub, Hamed et al. 2010). Altri meccanismi alla base della sua azione sarebbero l'attivazione diretta di mediatori dell'apoptosi e la formazione di canali a livello della membrana mitocondriale, che ne causano la permeabilizzazione. Inoltre, elevati livelli di ceramide favoriscono la concentrazione di recettori FAS e TRAIL a livello della membrana cellulare (Sauane, Su et al. 2010). L'identificazione nello stress cellulare di un fattore fondamentale per l'insorgenza degli effetti terapeutici di MDA-7/IL-24 è stato ulteriormente confermato da recenti osservazioni sull'utilizzo di OSU-03012. Questo derivato degli inibitori della COX-2 aumenta gli effetti di MDA-7/IL-24 sulla morte cellulare, inducendo l'aumento dello stress a livello del reticolo endoplasmatico e l'autofagia (Hamed, Yacoub et al. 2010).

La saturazione dei meccanismi di compenso legati all'autofagia e la contemporanea induzione del processo apoptotico sarebbero alla base dei sorprendenti effetti antineoplastici di MDA-7/IL-24 (Emdad, Lebedeva et al. 2009; Germano, Emdad et al. 2010).

La dimostrazione del bystander effect ha indotto anche un approfondimento delle ricerche in merito a possibili meccanismi di segnale intercellulare che siano alla base dell'effetto antitumorale complessivo di MDA-7/IL-24.

In virtù della sua appartenenza alla classe delle interleuchine, sono stati studiati gli effetti di MDA-7/IL-24 sulle cellule del sistema immunitario. L'espressione di *MDA-7/IL-24* è stata descritta a livello del timo, della milza e delle cellule ematiche della serie bianca. Essa è espressa in modo preferenziale a livello dei linfociti CD4+, soprattutto del sottotipo Th2 e dei monociti. In generale, pare che MDA-7/IL-24 presenti degli effetti opposti a quelli di IL-10, ovvero mostri capacità immunomodulatorie e proinfiammatorie (Caudell, Mumm et al. 2002). Si ritiene che questo tipo di azione, immunomodulante, rappresenti la funzione fisiologica di *MDA-7/IL-24*.

Un ulteriore aspetto che è stato valutato è relativo alle proprietà antiangiogeniche di *MDA-7/IL-24*. I risultati sperimentali hanno dimostrato l'inibizione della differenziazione delle cellule endoteliali, in modo del tutto simile a quanto riscontrato per IFN- γ (Maheshwari, Srikantan et al. 1991), e l'inibizione della migrazione e della capacità di invasione delle cellule HUVEC (Fisher, Gopalkrishnan et al. 2003). Inoltre, è stata osservata l'inibizione dell'espressione di VEGF, IL-8, TGF- β e bFGF, molecole notoriamente implicate nei meccanismi dell'angiogenesi, nonché inibizione della neoangiogenesi in vivo (Saeki, Mhashilkar et al. 2002; Fisher, Gopalkrishnan et al. 2003). Anche sMDA7/sIL-24 ha mostrato di possedere un potente effetto antiangiogenico, superiore a quello dell'endostatina (Yamaguchi, Anand-Apte et al. 1999; Fisher, Gopalkrishnan et al. 2003). È infine interessante notare che *MDA-7/IL-24* svolge

un'azione inibitoria sulla migrazione e sui meccanismi alla base dell'invasione neoplastica (Ramesh, Ito et al. 2004).

Nel GBM *MDA-7/IL-24* interferisce con molteplici cascate di segnale intracellulare, in particolare inibisce le vie di ERK1/2, PI3K ed AKT mentre attiva la via di JNK e P38 (Yacoub, Gupta et al. 2008; Yacoub, Park et al. 2008). È stata inoltre descritta l'attivazione della cascata di PERK e ATG5, legata all'induzione di autofagia (Yacoub, Hamed et al. 2008). Un effetto particolarmente intrigante di *MDA-7/IL-24* nel GBM è la capacità di colpire con particolare predilezione le cellule neoplastiche CD133+, considerate elementi staminali particolarmente aggressivi, altamente refrattari alle comuni terapie e responsabili dell'insorgenza delle recidive (Yacoub, Hamed et al. 2008). Recentemente sono state riportate esperienze iniziali che confermano gli effetti terapeutici di *MDA-7/IL-24*, utilizzando come vettori astrociti ingegnerizzati derivati da cellule staminali embrionali (Germano, Emdad et al. 2010).

La capacità di *MDA-7/IL-24* ad interagire con molteplici meccanismi antineoplastici, legati al controllo della proliferazione e della morte cellulare, alla neoangiogenesi ed alla modulazione della risposta immunitaria, hanno suscitato grande entusiasmo nella comunità scientifica. La definizione di "magic bullet" indica le grandi aspettative riposte in questo approccio terapeutico contro le neoplasie (Sarkar, Lebedeva et al. 2007).

Scopo del lavoro

Sulle premesse teoriche sin qui enunciate si inserisce il presente lavoro. Il suo scopo è quello di descrivere le procedure sperimentali volte a caratterizzare gli effetti del gene *MDA-7/IL-24* su cellule di glioma umano ad alto grado U87, utilizzando come vettore gli astrociti differenziati a partire da cellule staminali embrionali murine. Le procedure sperimentali, in vitro ed in un modello animale, sono state condotte presso i laboratori di terapia genica neuro-oncologica del Dipartimento di Neurochirurgia del Mount Sinai Medical Center di New York

(USA), nell'ambito di una collaborazione esistente tra il suddetto Centro ed il Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Sassari.

MATERIALI E METODI

Esperimenti in vitro

Allestimento e caratterizzazione di cellule staminali embrionali murine esprimenti il transgene tet-inducibile MDA-7/IL-24

Le cellule staminali embrionali di topo (mESC) utilizzate nelle procedure sperimentali appartengono ad uno stock precedentemente geneticamente modificato al fine di esprimere il gene *MDA-7/IL-24* a seguito della somministrazione di tetracicline (Germano, Emdad et al. 2010). L'allestimento della linea cellulare é stato ottenuto mediante l'utilizzo di cellule staminali embrionali di topo Ainv-18 (donate dal Dr. Michael Kyba). Successivamente, un cDNA contenente l'intera sequenza codificante la proteina MDA-7/IL-24 umana (pCMV MDA7; Paul Fisher, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA) é stata clonata nel vettore pLox (donato dal Dr. M. Kyba) e sequenziata (Mount Sinai School of Medicine Core Sequencing Facility). I DNA plasmidici *MDA-7/IL-24* pLox ed helper esprimente la Cre recombinasi sono stati preparati mediante un sistema di purificazione a colonna (Qiagen, CA) ed elettroporati all'interno delle cellule staminali embrionali di topo Ainv-18 appositamente allestite. Le cellule Ainv-18 trattate sono state seminate su substrato con concentrazioni crescenti di G418. Le colonie clonali resistenti al G418 sono state successivamente selezionate ed espanse.

L'inserimento del transgene nel sito di clonaggio Lox é stato confermato mediante PCR, immunocitochimica e citometria di flusso:

- Template di DNA per PCR – Forward Primer: 5'-CTC GAG GCC GCC ACC ATG AAT TTT CAA CAG-3'; Reverse: 5'-TCT AGA GCT TGT AGA ATT TCT GCA-3'; condizioni: 30 cicli, 2 min 98°C denaturazione, 20 sec 95°C denaturazione, 20 sec 55°C raffreddamento, 60 sec 68°C estensione, 10 min 68°C elongazione.

- Immunocitochimica – Anticorpi policlonali di coniglio anti GFAP (Dako, CA) 1:200, anti MDA-7/IL-24 (Paul Fisher, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA) 1:200 in soluzione di BSA (1%) in PBS.
- Western blot – Valutazione di anticorpi monoclonali di topo anti MDA-7/IL-24 (GenHunter Corp.) rispetto all'espressione di Actina di controllo (anti-actina murina, clone C4, Millipore).
- Citometria di flusso – Anticorpi monoclonali di topo per IL-24 umana (GeneHunter Corp., TN).

Coltura delle cellule staminali embrionali murine e loro differenziazione in astrociti

Le cellule staminali embrionali transgeniche di topo indifferenziate sono state seminate su fibroblasti embrionali di topo (mEF) e successivamente trasferite su piastre di coltura rivestite di gelatina. Dopo 2 passaggi di coltura in gelatina é stato permesso loro di crescere formando corpi embrionali (EB) a bassa densità (10^5 cellule/piastra di 6 cm) per 6 giorni. Gli EB sono stati successivamente seminati in piastre di coltura rivestite di gelatina ed incubati in una serie di terreni di coltura senza siero (SP, SR, R1 and R2 media). Dopo circa 14 giorni dalla semina, gli EB mostravano differenziamento in cellule dalla morfologia sia stellata che più compatta suggerendo una popolazione mista di astrociti di tipo 1 e tipo 2.

PROTOCOLLO – DIFFERENZIAZIONE DI mESC IN ASTROCITI

GIORNO 1: SEMINA DEI mEF (Fibroblasti embrionali di topo)

- 1 – Utilizzare piastre di coltura a 6 pozzetti
- 2 – Rivestire i pozzetti di gelatina (Gelatina al 0.1% per almeno 20 minuti).
- 3 – Aggiungere i mEF. I mEF vengono irradiati in modo da evitare ulteriore crescita. Sono indispensabili in quanto rilasciano nel terreno di coltura dei fattori di crescita che promuovono la proliferazione delle cellule staminali.

mEF

- a) Derivati da embrioni di topo
- b) Procedere con la coltura sino ad ottenere uno stock di 10 piastre (crescita molto lenta)
- c) Trasferire in una singola provetta
- d) Irradiare (30-40 Gy) per bloccare il potenziale di crescita
- e) Congelare a -80°C sino a nuovo utilizzo delle cellule...

- f) ... scongelare i mEF a bagno maria in acqua a 37°C e successivamente trasferire in soluzione con 85% di terreno IMDM + 15% di FBS
- g) Centrifugare a 1200 giri/min per 5 minuti e cambiare il terreno per eliminare il terreno di congelamento DMSO (Dimetil-solfossido)
- h) Aggiungere una soluzione di 85% IMDM + 15% FBS e risospendere le cellule

SEMINA DELLE mESC (Cellule staminali embrionali di topo)

4 – Il giorno seguente, aggiungere le mESC alle piastre con i mEF.

mESC

- a) Derivate da embrioni di topo, sono disponibili linee cellulari geneticamente modificate
- b) Congelare a -80°C sino a nuovo utilizzo delle cellule...
- c) ... scongelare le mESC a bagno maria in acqua a 37°C e successivamente trasferire in soluzione con 85% di terreno IMDM + 15% di FBS
- d) Centrifugare a 1200 giri/min per 5 minuti e cambiare il terreno per eliminare il terreno di congelamento DMSO (Dimetil-solfossido)
- e) Aggiungere terreno di coltura IMDM-ES e risospendere le cellule
- f) Seminare le mESC in soluzione in IMDM-ES sopra i mEF in coltura
- g) Proseguire la coltura sino a che le colonie non siano confluenti

GIORNI 3-6: PASSAGGIO DELLE mESC IN COLTURA

5 – Le ESC di topo crescono in coltura sino ad apparire, al microscopio ottico invertito, sotto forma di colonie cellulari confluenti. A questo punto possono essere distribuite in 2-3 piastre rivestite in gelatina senza substrato. Le cellule

dovrebbero essere trasferite in nuove piastre di coltura almeno due volte per consentire l'eliminazione dei mEF prima di iniziare la formazione degli EB (corpi embrionali).

DIVISIONE DELLE mESC

- a) Rivestire le piastre di gelatina
- b) Tripsinizzare le colonie di mESC (1 ml/pozzetto di tripsina per massimo 3 minuti)
- c) Trasferire le cellule tripsinizzate in una nuova provetta con terreno di risciacquo IMDM
- d) Centrifugare a 1200 giri/min per 5 minuti e rimuovere il terreno per eliminare la tripsina
- e) Aggiungere terreno di coltura IMDM-ES e risospendere le cellule
- f) Seminare le cellule in 2-3 piastre diverse con terreno IMDM-ES

GIORNO 7: SEMINA DEGLI EB (FASE 1)

6 – Semina degli EB (Corpi embrionali) (fase 1). Dopo 1-2 passaggi delle colture di mESC in terreni privi di substrato (senza mEF) le cellule possono essere seminate al fine di sviluppare gli EB.

SEMINA DEGLI EB

- a) Tripsinizzare le colonie di mESC (1 ml/pozzetto di tripsina per massimo 3 minuti)
- b) Trasferire le cellule tripsinizzate in una nuova provetta con terreno di risciacquo IMDM
- c) Centrifugare a 1200 giri/min per 5 minuti e rimuovere il terreno per eliminare la tripsina
- d) Aggiungere terreno IMDM e risospendere le cellule

- e) Ripetere il risciacquo e la centrifuga delle cellule una seconda volta
- f) Sospendere le mESC in terreno SP
- g) Contare le cellule con la camera emocitometrica
- h) Seminare 10^5 cellule in ogni piastra in un volume pari a 5 ml di terreno SP, usare piastre di Petri da 6 cm per prevenire l'adesione delle mESC, dividere il pool cellulare totale in circa 20 piastre

GIORNI 8-9: CRESCITA DI EB DI PICCOLE DIMENSIONI IN SOSPENSIONE

GIORNO 10: SEMINA DEGLI EB (FASE 2)

7 – Semina degli EB (fase 2). Dopo 2 giorni di coltura in sospensione nel terreno SP gli EB sono cresciuti sino a formare delle piccole colonie rotondeggianti (EB di piccole dimensioni). Il trasferimento degli EB di piccole dimensioni in coltura con terreno SR consentirà lo sviluppo di EB di grandi dimensioni.

- a) Centrifugare gli EB di piccole dimensioni a 1200 giri/min per 5 minuti ed eliminare il terreno
- b) Aggiungere il terreno SR e risospendere le cellule in un volume uguale a quello del terreno SP
- c) Seminare 10^5 cellule in ogni piastra in un volume pari a 5 ml di terreno SR, usare piastre di Petri da 6 cm per prevenire l'adesione delle mESC, dividere il pool cellulare totale in circa 20 piastre
- d) Mantenere in coltura per 4 giorni in terreno SR

GIORNI 11-14: CRESCITA DI EB DI GRANDI DIMENSIONI IN SOSPENSIONE

GIORNI 15-20: DIFFERENZIAZIONE DEGLI ASTROCITI (Fase 1)

8 – Differenziazione degli astrociti (Fase 1). La coltura delle cellule verrà proseguita in piastre a 6 pozzetti rivestite di gelatina. La stessa quantità di cellule

precedentemente coltivata in una piastra di Petri da 6 cm sarà seminata in ciascuno dei pozzetti delle piastre a 6 pozzetti.

DIFFERENZIAZIONE DEGLI ASTROCITI

- a) Raccogliere gli EB di grandi dimensioni in una provetta tipo Falcon da 50 ml
- b) Lasciare riposare gli EB per 15 minuti
- c) Eliminare il terreno SR
- d) Risospendere gli EB in terreno R1
- e) Seminare le cellule in piastre a 6 pozzetti rivestite di gelatina
- f) Mantenere in coltura per 5 giorni in terreno R1, cambiare il terreno a giorni alterni

GIORNI 21-23: DIFFERENZIAZIONE DEGLI ASTROCITI (Fase 2)

- a) Sostituire il terreno di coltura con quello R2
- b) Mantenere in coltura per almeno 2 giorni con terreno R2, ovvero sino a quando non sia completata la differenziazione
- c) Dopo aver raggiunto la completa differenziazione possono essere effettuati 2-3 passaggi in coltura prima che le cellule inizino a deteriorarsi.

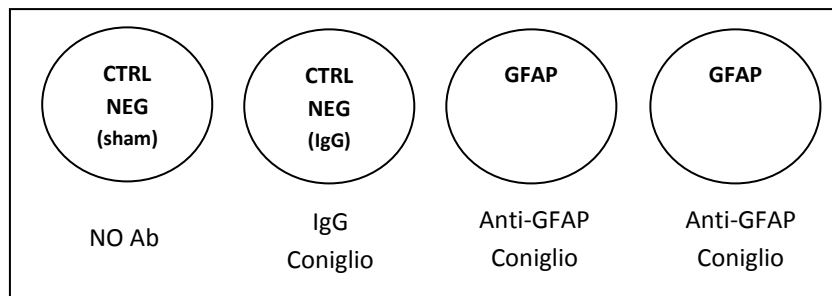
Caratterizzazione degli astrociti ottenuti da mESC transgeniche

La caratterizzazione morfologica degli astrociti è stata effettuata mediante l'osservazione al microscopio invertito, sia in condizioni di luce diretta che in contrasto di fase (Olympus CKX31; Leica DMI 4000 B), e successiva documentazione fotografica (Canon Ixus V3; Leica DFC 340 FX).

Per l'approfondimento dello studio morfologico delle cellule è stata effettuata incubazione con anticorpi anti-GFAP (Sigma, MO), ulteriore colorazione con DAPI (Sigma, MO), osservazione mediante microscopia ad immunofluorescenza (Leica DMI 4000 B) e documentazione fotografica (Leica DFC 340 FX). La differenziazione in senso astrocitico delle cellule è stata dimostrata dalla colorazione con GFAP, la cui espressione è stata ulteriormente confermata mediante separazione cellulare attivata dalla fluorescenza (FACS).

PROTOCOLLO – COLORAZIONE IN IMMUNOFLUORESCENZA PER GFAP IN ASTROCITI DERIVATI DA CELLULE STAMINALI EMBRIONALI DI TOPO CON TRANSGENE MDA-7 INDUCIBILE DALLA DOXICICLINA

Piastra a 24 pozzetti con colonie di astrociti in coltura:

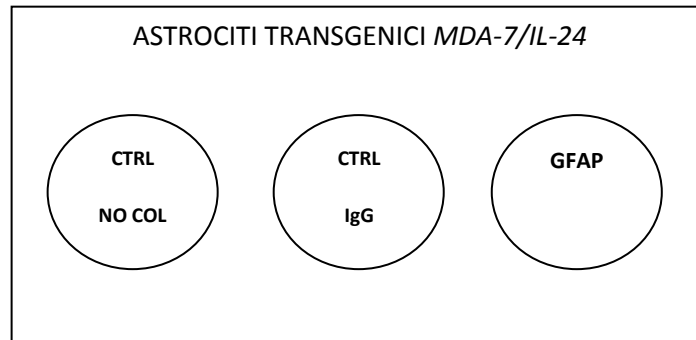


- 1- Lavare una volta in PBS
- 2- Fissare con paraformaldeide (PFA) al 4% in PBS per 25 minuti a temperatura ambiente (RT) sull'agitatore
- 3- Risciacquare 3 volte con PBS

- 4- Aggiungere Triton-X al 0.1% (surfactante) in PBS per 15 minuti a RT sull'agitatore
- 5- Risciacquare 3 volte con PBS
- 6- Bloccare con siero di capra 10% + Albumina di siero bovino 1% in soluzione di Saponina al 0.5% in PBS. Aggiungere circa 500 µl di soluzione per pozzetto per 1 h a RT sull'agitatore
- 7- Incubare con l'anticorpo primario (IgG anti Glial Fibrillary Acid Protein di coniglio, Sigma) 1:100 in soluzione di bloccaggio per una notte a 4°C sull'agitatore. Utilizzare IgG oligoclonali isotipo-specifiche come controllo negativo
- 8- Il giorno successivo risciacquare 3 volte con tampone di saponina (Saponina al 0.5% in PBS). Ogni risciacquo per 5 minuti a RT sull'agitatore
- 9- Incubare con l'anticorpo secondario (Anticorpo di capra anti-coniglio marcato con Alexa-488, concentrazione 1:200) in tampone di saponina al buio per 1 h a RT sull'agitatore
- 10- Risciacquare 3 volte con tampone di saponina (Saponina al 0.5% in PBS). Ogni risciacquo per 5 minuti a RT sull'agitatore al buio. Aggiungere 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI) al risciacquo finale (0.5 µg/ml di tampone PBS)
- 11- Risciacquare un'ultima volta con PBS e conservare le cellule in PBS.

PROTOCOLLO – VALUTAZIONE FACS IN VITRO DI GFAP IN ASTROCITI DERIVATI DA CELLULE STAMINALI EMBRIONALI DI TOPO CON TRANSGENE MDA-7 INDUCIBILE DALLA DOXICICLINA

Piastre a sei pozzetti con colonie di astrociti in coltura:



- 1- Tripsinizzare le colonie cellulari in coltura (1 ml/pozzetto per 3-5 minuti)
- 2- Bloccare con Siero bovino fetale (FCS) e mescolare pipettando onde ottenere una sospensione di singole cellule
- 3- Risciacquare una volta con PBS 1x
- 4- Allestire il tampone per FACS:
 - a. 0.1% di Albumina di siero bovino (BSA)
 - b. 0.02% di Azoturo di sodio
 - c. 10% di Siero bovino fetale (FCS)
 - d. PBS 1x
- 5- Fissare con Paraformaldeide (PFA) al 4% in tampone FACS per 15-20 minuti a RT
- 6- Centrifugare le cellule a 1000 giri/min per 5 minuti e risciacquare una volta con PBS 1x
- 7- Aggiungere il surfactante Triton-X allo 0.1% al tampone per FACS per 5 minuti a RT

- 8- Centrifugare le cellule a 1000 giri/min per 5 minuti e risciacquare una volta con tampone alla saponina (Saponina allo 0.5% in tampone per FACS)
- 9- Trasferire le cellule in una piastra a 96 pozzetti con fondo a U
- 10- Bloccare con siero anti-topo al 10% in tampone alla saponina al 0.5% per 1 ora a RT
- 11- Incubare con l'anticorpo primario (Anticorpo anti-GFAP di topo alla concentrazione di 1:200, Sigma) in soluzione di bloccaggio per una notte a 4°C sull'agitatore. Utilizzare IgG di topo isotipo specifiche come controllo negativo
- 12- Il giorno seguente risciacquare 3 volte con tampone alla saponina
- 13- Incubare con l'anticorpo secondario (Anticorpo anti-Ig di topo coniugato con FITC alla concentrazione di 1:200, Sigma) in tampone alla saponina per 30 min-1 h a RT
- 14- Risciacquare per 3 volte con tampone alla saponina
- 15- Risospendere le cellule in tampone per FACS ed analizzare in citometria di flusso (FACS).

Induzione dell'espressione genica attraverso la somministrazione di doxiciclina in astrociti transgenici MDA-7/IL-24

Come precedentemente descritto, gli astrociti sono stati ottenuti dalla differenziazione a partire da cellule staminali murine in cui il transgene *MDA-7/IL-24* viene espresso in modo reversibile a seguito della somministrazione di tetracicline. Tutte le procedure sperimentali in cui era prevista la valutazione degli effetti dell'espressione di *MDA-7/IL-24* sono state precedute dall'esposizione delle colture di astrociti alla doxiciclina alla dose di 1 µg/ml.

PROTOCOLLO – INDUZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL GENE MDA-7/IL-24 IN COLTURE DI ASTROCITI TRANSGENICI

Trattamento delle cellule

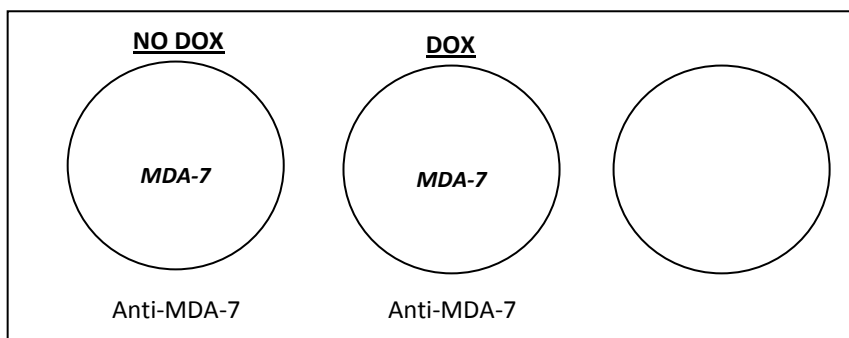
- 1- Utilizzare una piastra di coltura di astrociti transgenici *MDA-7/IL-24* derivati da cellule staminali embrionali di topo
- 2- Eliminare il terreno di coltura dai pozzetti
- 3- Aggiungere il terreno 10% IMDM
- 4- Aggiungere la doxiciclina (1 µg/ml di 10% IMDM)
- 5- Incubare per 24-72 ore
- 6- Procedere alla caratterizzazione delle proprietà delle cellule in coltura.

Analisi dell'espressione genica indotta da doxiciclina in astrociti transgenici MDA-7/IL-24

La valutazione dell'espressione del transgene *MDA-7/IL-24* indotta dalla doxiciclina è stata effettuata sia mediante caratterizzazione morfologica in immunofluorescenza per MDA-7/IL-24 che attraverso metodiche di biologia molecolare (Western blot, rt-PCR e FACS).

PROTOCOLLO – COLORAZIONE IN IMMUNOFLUORESCENZA PER MDA-7 IN ASTROCITI DERIVATI DA CELLULE STAMINALI EMBRIONALI DI TOPO CON TRANSGENE MDA-7 INDUCIBILE DALLA DOXICICLINA

Piastra a 6 pozzetti con colonie di astrociti in coltura:

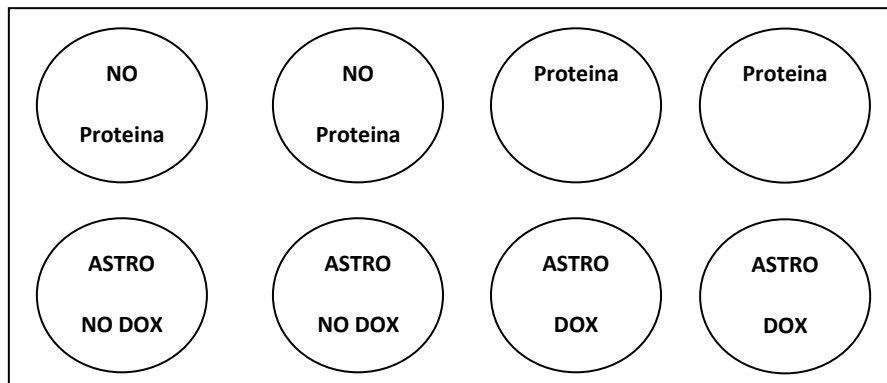


- 1- Risciacquare una volta in PBS
- 2- Fissare con Paraformaldeide (PFA) al 4% in PBS per 25 minuti a temperatura ambiente (RT) sull'agitatore
- 3- Risciacquare 3 volte con PBS
- 4- Aggiungere Triton-X al 0.1% (surfactante) in PBS per 15 minuti a RT sull'agitatore
- 5- Risciacquare 3 volte con PBS
- 6- Bloccare con siero di asino 10% + Albumina di siero bovino 1% in soluzione di Saponina al 0.5% in PBS. Aggiungere circa 500 µl di soluzione per pozzetto per 1 h a RT sull'agitatore

- 7- Incubare con l'anticorpo primario (IgG anti mda-7 di coniglio, Sigma) 1:200 in soluzione di bloccaggio per una notte a 4°C sull'agitatore
- 8- Il giorno successivo risciacquare 3 volte con tampone di saponina (Saponina al 0.5% in PBS). Ogni risciacquo per 5 minuti a RT sull'agitatore
- 9- Incubare con l'anticorpo secondario (Anticorpo anti-coniglio marcato con Alexa-488, concentrazione 1:200) in tampone di saponina al buio per 1 h a RT sull'agitatore
- 10- Risciacquare 3 volte con tampone di saponina (Saponina al 0.5% in PBS). Ogni risciacquo per 5 minuti a RT sull'agitatore al buio. Aggiungere 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI) al risciacquo finale (0.5 µg/ml di tampone PBS)
- 11- Risciacquare un ultima volta con PBS e conservare le cellule in PBS.

PROTOCOLLO – VALUTAZIONE WESTERN BLOT DELL'ESPRESSIONE GENICA IN ASTROCITI DERIVATI DA CELLULE STAMINALI EMBRIONALI DI TOPO CON TRANSGENE MDA-7 INDUCIBILE DALLA DOXICICLINA

Piastra a sei pozzetti con colonie di astrociti in coltura:



Estrazione della proteina dalle cellule in coltura in piastra a sei pozzetti:

- 1- Rimuovere il terreno dai pozzetti
- 2- Risciacquare una volta con PBS

- 3- Aggiungere 100 µl di tampone RIPA + inibitori (inibitori delle proteasi e delle fosfatasi) per 10 minuti in ghiaccio
- 4- Rimuovere meccanicamente le colonie cellulari dai pozzetti
- 5- Trasferire le cellule rimosse in provette tipo Eppendorf
- 6- Centrifugare le provette a 13.200 giri/min per 15 minuti a 4 °C
- 7- Raccogliere il surnatante (la procedura può essere interrotta congelando i campioni a -80°C e continuata in qualsiasi momento scongelandoli in ghiaccio)

Valutazione della concentrazione proteica totale del campione (misurazione della densità ottica – OD)

- 8- Allestire diluizioni seriali (2 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0 µg/ml) di albumina di siero bovino (BSA) di riferimento in tampone RIPA (Boston Bioproducts)
- 9- Marcare le diluizioni seriali di BSA ed i campioni sperimentali con il kit di analisi BCA™ (Thermo Scientific)
- 10- Incubare i campioni a 37°C per 30 minuti
- 11- Misurare la OD (Labsystems Multiskan RC, Fisher Scientific, lunghezza d'onda 570 nm), i campioni possono essere congelati e successivamente scongelati in ghiaccio

Western Blot per MDA-7

- 12- Preparare il Gel per la corsa:
 - a. 10 ml di ProtoGel Quick Cast (National Diagnostics) al 12%
 - b. 100 µl di Ammonio Persolfato al 10% (10% APS, Sigma)
 - c. 10 µl di Tetrametil-etilendiamina (TEMED, National Diagnostics)

13- Preparare il Gel di impaccamento:

- a. 2 ml di ProtoGel Quick Cast (National Diagnostics) al 12%
- b. 3 ml di H₂O deionizzata
- c. 25 µl di Ammonio Persolfato al 10% (10% APS, Sigma)
- d. 12.5 µl di Tetrametil-etilendiamina (TEMED, National Diagnostics)

14- Mescolare 20 µg di campione proteico con un volume di Sodio dodecil solfato (Laemmli's SDS Sample Buffer, Boston Bioproducts) pari a 1/6 del volume del campione proteico

15- Bollire i campioni per 5 minuti e lasciarli in ghiaccio sino alla corsa sul gel

16- Caricare 20 µg di ogni campione ed effettuare la corsa sul gel a 100 V sino a che i campioni hanno superato il livello del gel di impaccamento e successivamente a 200 V per 1 h, ovvero sino a che la corsa sia completata (BioRad mini protean tetra cell)

17- Immergere il gel per 10 minuti nel tampone di trasferimento 1x

18- Preparare la membrana di trasferimento (Membrana per western blot PDVF, Roche):

- a. Immergere la membrana in metanolo per 1 minuto
- b. Risciacquare con acqua deionizzata
- c. Immergere nel tampone di trasferimento

19- Iniziare il trasferimento ad 80 V per 2 ore a 4°C (BioRad mini protean tetra cell)

20- Bloccare la membrana per 1 ora sull'agitatore a RT immergendola in una soluzione di latte al 5% in TBS Tween

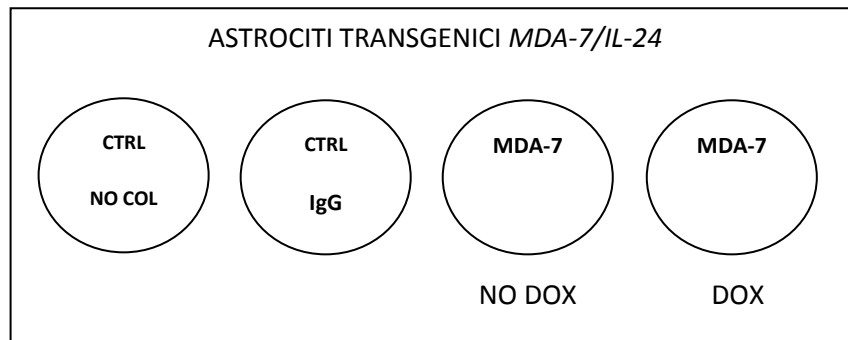
- 21- Incubare con anticorpo primario alla concentrazione di 1:1000 (anticorpo monoclonale umano anti-mda-7 murino, GenHunter Corp.) in latte al 5% a 4°C sull'agitatore per una notte
- 22- Risciacquare 3 volte in TBS Tween 1x (10 minuti a risciacquo)
- 23- Incubare con anticorpo secondario (anti topo alla concentrazione di 1:2000) per 1 h sull'agitatore a RT
- 24- Risciacquare 3 volte con TBS Tween 1x (10 minuti a risciacquo)
- 25- Incubare con il reagente di rivelazione per western blot Amersham ECL Plus™ (GE Healthcare) per 5 minuti
- 26- Sviluppare la membrane su pellicola in camera oscura

Western Blot per Actina

- 27- Risciacquare la membrane per 3 volte con TBS Tween rispettivamente per 15-10-10 minuti sull'agitatore a RT
- 28- Bloccare la membrana con latte al 5% per 1 h sull'agitatore a RT
- 29- Incubare con anticorpo primario alla concentrazione di 1:500 (Anticorpo murino anti actina, clone C4, Millipore) in Albumina di siero bovino (BSA) al 5% a 4°C sull'agitatore per una notte
- 30- Risciacquare 3 volte in TBS Tween 1x (10 minuti a risciacquo)
- 31- Incubare con anticorpo secondario (anti topo alla concentrazione di 1:2000) per 1 h sull'agitatore a RT
- 32- Risciacquare 3 volte in TBS Tween 1x (10 minuti a risciacquo)
- 33- Incubare con il reagente di rivelazione per western blot Amersham ECL Plus™ (GE Healthcare) per 5 minuti
- 34- Sviluppare la membrane su pellicola in camera oscura.

PROTOCOLLO – VALUTAZIONE FACS IN VITRO DI MDA-7 IN ASTROCITI DERIVATI DA CELLULE STAMINALI EMBRIONALI DI TOPO CON TRANSGENE MDA-7 INDUCIBILE DALLA DOXICICLINA

Piastre a sei pozzetti con colonie di astrociti in coltura:



- 1- Tripsinizzare le colonie cellulari in coltura (1 ml/pozzetto per 3-5 minuti)
- 2- Bloccare con Siero bovino fetale (FCS) e mescolare pipettando onde ottenere una sospensione di singole cellule
- 3- Risciacquare una volta con PBS 1x
- 4- Allestire il tampone per FACS:
 - a. 0.1% di Albumina di siero bovino (BSA)
 - b. 0.02% di Azoturo di sodio
 - c. 10% di Siero bovino fetale (FCS)
 - d. PBS 1x
- 5- Fissare con Paraformaldeide (PFA) al 4% in tampone FACS per 15-20 minuti a RT
- 6- Risciacquare una volta con PBS 1x
- 7- Aggiungere il surfactante Triton-X allo 0.1% al tampone per FACS per 5 minuti a RT

- 8- Risciacquare una volta con tampone alla saponina (Saponina allo 0.5% in tampone per FACS)
- 9- Trasferire le cellule in una piastra a 96 pozzetti con fondo a U
- 10- Bloccare con siero anti-coniglio al 10% in tampone alla saponina al 0.5% per 1 ora a RT
- 11- Incubare con l'anticorpo primario (Anticorpo anti-MDA-7 di coniglio alla concentrazione di 1:200, Paul Fisher, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA) in soluzione di bloccaggio per una notte a 4°C sull'agitatore. Utilizzare IgG di coniglio isotipo specifiche come controllo negativo
- 12- Il giorno seguente risciacquare 3 volte con tampone alla saponina
- 13- Incubare con l'anticorpo secondario (Anticorpo anti-Ig di coniglio coniugato con FITC alla concentrazione di 1:200, Sigma) in tampone alla saponina per 30 min-1 h a RT
- 14- Risciacquare 3 volte con tampone alla saponina
- 15- Risospendere le cellule in tampone per FACS ed analizzare in citometria di flusso (Citofluorimetro Facscalibur e Software Cellquest, Becton Dickinson).

Analisi della migrazione degli astrociti transgenici MDA-7/IL-24

La capacità migratoria delle cellule é stata valutata in vitro mediante l'utilizzo dei pozzetti di migrazione Transwell® (Transwell® permeable supports, Corning Inc, NY). I pozzetti di migrazione consistono in piastre da 24 pozzetti con membrane di separazione in policarbonato semipermeabili, con pori del diametro di 8 µm.

Le camere di incubazione superiore ed inferiore di ogni pozzetto sono state riempite con un volume pari a 500 µl del terreno di coltura IMDM al 10%, contenente 5×10^4 cellule. A livello dei pozzetti inferiori e superiori sono state aggiunte rispettivamente cellule di glioma umano U251 ed astrociti transgenici derivati da mESC.

É stato consentito agli astrociti, incubati alle usuali condizioni di coltura, di migrare attraverso le membrane semipermeabili sia in presenza che in assenza delle cellule tumorali nei pozzetti inferiori. Sono state utilizzate cellule di glioma umano ad alto grado U251 e U87.

La migrazione é stata valutata dopo 36 e 72 ore con due metodi differenti:

1. Al termine del periodo di incubazione con cellule U251, il terreno di coltura é stato rimosso dai pozzetti e gli astrociti residui sono stati eliminati meccanicamente dalla superficie superiore delle membrane semipermeabili in policarbonato del sistema Transwell®. Le cellule migrate, adese alla superficie inferiore delle membrane semipermeabili, sono state fissate e colorate con un apposito kit di colorazione basato sulla metodica tradizionale di Wright-Giemsa (Protocol® Hema 3® Stain Set, Fisher Diagnostics). La conta degli astrociti adesi alla superficie inferiore delle membrane semipermeabili é stata effettuata mediante l'uso del microscopio ottico invertito. Sono stati considerati nove campi ad alto ingrandimento (200x) per ogni pozzetto, tale analisi comprendeva la gran parte della superficie della membrana semipermeabile approssimandosi ad un conteggio esaustivo. Avendo a disposizione 3

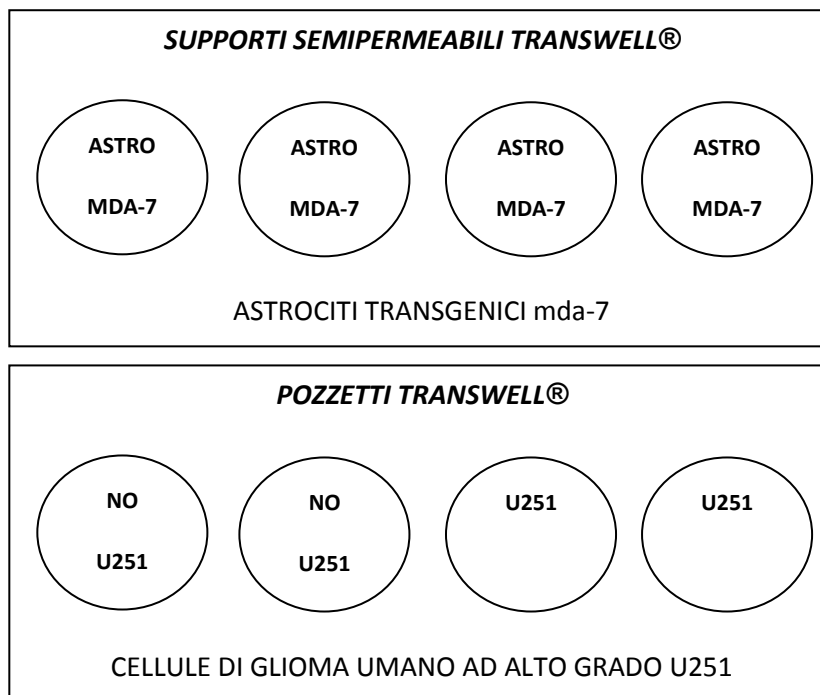
pozzetti per ogni condizione sperimentale, i valori del conteggio cellulare sono stati in seguito valutati come valori medi.

2. Al termine del periodo di incubazione con cellule U87, il terreno di coltura é stato rimosso dai pozzetti inferiori e gli astrociti presenti nei pozzetti superiori sono stati tripsinizzati, raccolti e contati in camera ematocitometrica. La conta cellulare é stata effettuata ai quattro angoli della camera ematocitometrica ed i valori medi sono stati utilizzati per stimare la conta complessiva. Al fine di standardizzare ulteriormente la procedura é stata effettuata una conta cellulare dei pozzetti superiori due ore dopo la semina, allorquando si presume che la migrazione non sia ancora avvenuta. I valori ottenuti erano compatibili con quelli del pool di cellule seminate (5×10^4). Le cellule mancanti dal pool iniziale seminato nel pozzetto superiore sono state considerate come cellule migrate ed espresse come valore percentuale di quello basale.

L'ipotesi nulla dell'assenza di differenze tra i gruppi considerati é stata valutata mediante l'impiego del test statistico t di Student a due code per dati non appaiati. Valori di p inferiori a 0,05 sono stati considerati statisticamente significativi.

PROTOCOLLO – ANALISI DELLA MIGRAZIONE CON METODICA TRANSWELL® DI ASTROCITI DERIVATI DA CELLULE STAMINALI EMBRIONALI DI TOPO CON TRANSGENE MDA-7 INDUCIBILE DALLA DOXICICLINA

Utilizzare piastre a 24 pozzetti con supporti semipermeabili in policarbonato da 6.5 mm con pori del diametro di 8 µm (Supporti permeabili Transwell®, Corning Inc, NY):



1. Rivestire i supporti semipermeabili Transwell® con gelatina (500 µl/pozzetto/20 minuti)
2. Sospendere le cellule U251 in IMDM al 10%
3. Aggiungere la sospensione cellulare di U251 ai pozzetti Transwell® (5x10⁴ cellule/pozzetto)
4. Sospendere gli astrociti transgenici *MDA-7/IL-24* derivati da cellule staminali embrionali di topo in IMDM al 10%
5. Aggiungere la sospensione di astrociti ai supporti semipermeabili Transwell® (5x10⁴ cellule/supporto)

6. Incubare per 36/72 ore in condizioni di coltura standard
7. Eliminare il terreno e rimuovere meccanicamente le cellule dalla superficie superiore dei supporti semipermeabili Transwell®
8. Fissare e colorare le cellule sulla superficie inferiore dei supporti semipermeabili Transwell® con il kit di colorazione Protocol® Hema 3® (Fisher Diagnostics, VA)
9. Contare le cellule al microscopio ottico (9 campi, ingrandimento 200x).

Induzione dell'apoptosi di cellule di glioma ad alto grado U87

L'apoptosi delle cellule umane di glioma ad alto grado U87 (American Type Culture Collection, HTB-14™, Rockville, MD) é stata valutata dopo trattamento con proteina ricombinante MDA-7/IL-24 e dopo co-coltura con astrociti transgenici derivati da mESC con espressione inducibile da tetracicline del gene *MDA-7/IL-24*. La linea cellulare U87 utilizzata è commercialmente disponibile e può essere mantenuta in coltura senza particolari difficoltà utilizzando il terreno IMDM 10%. Le colture vengono riseminate in nuove piastre di Petri da 10 cm con 10 ml di terreno ogni 3-4 giorni, allorquando siano divenute confluenti.

PROTOCOLLO – INDUZIONE IN VITRO DELL'APOPTOSI ATTRAVERSO SOMMINISTRAZIONE DI PROTEINA RICOMBINANTE MDA-7 IN CELLULE DI GLIOMA UMANO AD ALTO GRADO U87

Semina delle cellule

- 1- Rivestire le piastre di gelatina (500 µl/piastra/20 minuti)
- 2- Tripsinizzare le cellule U87 (1ml/piastra/3 minuti)
- 3- Aggiungere al campione 9 ml di 10% IMDM
- 4- Contare le cellule nella camera emocitometrica
- 5- Risospendere le cellule in 10% IMDM per ottenere la concentrazione di 5×10^4 cellule/ml
- 6- Seminare 5×10^4 cellule (1 ml)/pozzetto in una piastra di coltura a 24 pozzetti
- 7- Incubare per 24 ore

Trattamento delle cellule

- 8- Eliminare il terreno dai pozzetti
- 9- Aggiungere 1 ml di 10% IMDM ad ogni pozzetto, nel gruppo di controllo

10- Aggiungere 1 ml di proteina ricombinante MDA-7 (20 µg/ml) ad ogni pozzetto, nel gruppo di trattamento

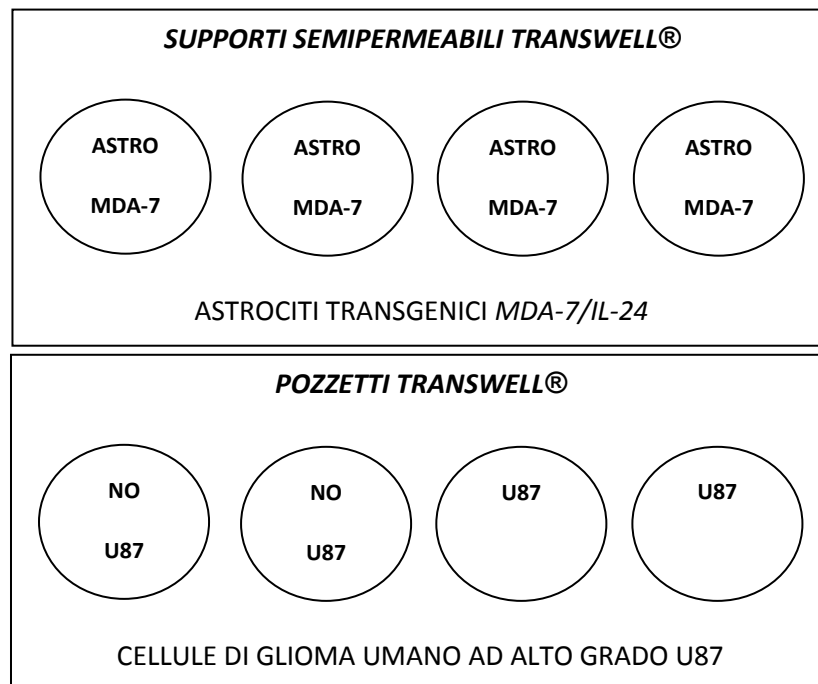
11- Incubare per 72 ore

12- Caratterizzare l'apoptosi delle cellule U87:

- a. Trypan blue
- b. FACS per Annessina V e per 7-AAD.

PROTOCOLLO – INDUZIONE IN VITRO DELL' APOPTOSI ATTRAVERSO ASTROCITI TRANSGENICI MDA-7 IN CELLULE DI GLIOMA UMANO AD ALTO GRADO U87

Utilizzare piastre a 24 pozzetti con supporti semipermeabili in policarbonato da 6.5 mm con pori del diametro di 8 µm (Supporti permeabili Transwell®, Corning Inc, NY):



Semina delle cellule

1- Rivestire i supporti semipermeabili con gelatina (500 µl/supporto/20 minuti)

- 2- Tripsinizzare le cellule di glioma umano ad alto grado U87 e gli astrociti transgenici mda-7 (1ml/pozzetto/3 minuti)
- 3- Aggiungere 9 ml di IMDM al 10% ad ogni campione
- 4- Contare le cellule nella camera emocitometrica
- 5- Risospendere le cellule in IMDM al 10% alla concentrazione di 5×10^4 cellule/ml
- 6- Seminare 5×10^4 cellule U87 (500 μ l)/pozzetto nei pozzetti inferiori della piastra di coltura a 24 pozzetti (Transwell®, Corning Inc, NY)
- 7- Seminare 5×10^4 astrociti transgenici *MDA-7/IL-24* (500 μ l)/pozzetto sui supporti semipermeabili della piastra di coltura a 24 pozzetti (Transwell®, Corning Inc, NY)
- 8- Incubare per 24 ore

Trattamento delle cellule

- 9- Eliminare il terreno dai pozzetti
- 10- Aggiungere 500 μ l di IMDM al 10% ai supporti semipermeabili ed ai pozzetti della piastra a 24 pozzetti nel gruppo di controllo (totale 1 ml/pozzetto)
- 11- Aggiungere 0.5 μ g di doxiciclina (1 μ g/ml di IMDM al 10%) ai supporti semipermeabili ed ai pozzetti della piastra nel gruppo sperimentale di trattamento (totale 1 ml/pozzetto)
- 12- Incubare per 72 ore
- 13- Valutare l'apoptosi delle cellule di glioma umano ad alto grado U87:
 - a. Colorazione con Trypan blue
 - b. Citometria di flusso FACS per Annexina V e per 7-AAD.

Valutazione dell'apoptosi di cellule di glioma ad alto grado U87

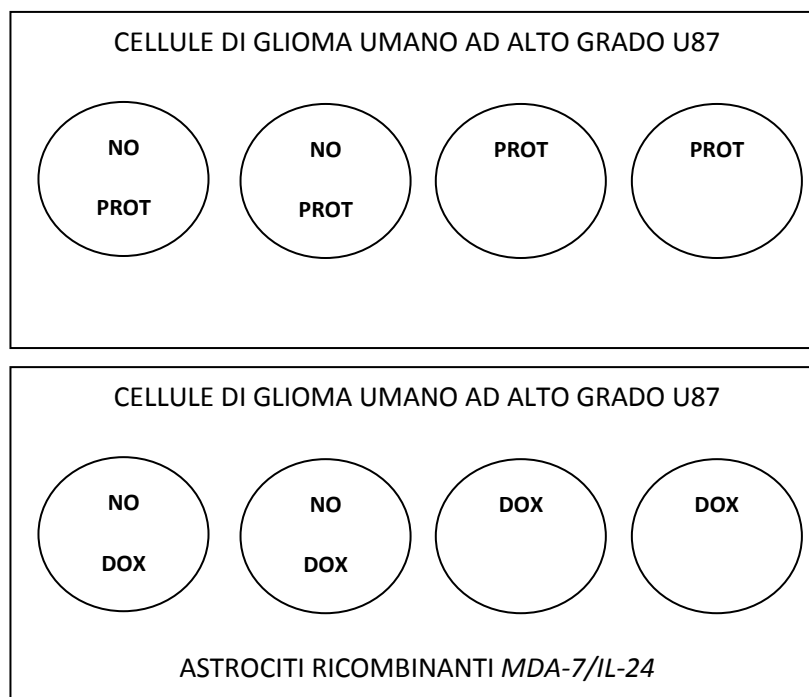
La valutazione dell'apoptosi é stata effettuata mediante due metodi diversi: la colorazione con Annessina V-PE e quella con Trypan blue.

L'annexina V é una proteina legante i fosfolipidi, Ca^{2+} dipendente, del peso di 35-36 kDa che mostra alta affinità per la fosfatidilserina (PS). Nelle cellule vitali la PS si trova sulla superficie interna della membrana cellulare ma sin dalle fasi precoci dell'apoptosi, molto prima che l'integrità della membrana plasmatica venga persa, viene esposta sulla superficie esterna della stessa. Pertanto le cellule positive alla colorazione con Annessina V sono quelle che si trovano nelle prime fasi del processo apoptotico.

Nei nostri esperimenti é stato utilizzata una forma di Annessina V legata al fluorocromo ficoeritrina (Annexin V-PE, BD Biosciences). Per poter distinguere le cellule apoptotiche da quelle con perdita aspecifica dell'integrità della membrana cellulare, sia per processo apoptotico che necrotico, la colorazione all'Annessina V-PE é stata combinata con il colorante vitale 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD, BD Biosciences). La 7-AAD mostra una spiccata affinità per il DNA e pertanto rivela un danno a livello delle membrane cellulare e nucleare con conseguente esposizione di tale molecola nell'ambiente extracellulare. Le cellule positive all'Annessina V-PE e negative alla 7-AAD si troverebbero nelle prime fasi dell'apoptosi mentre quelle negative ad entrambe sarebbero vitali. Le cellule positive ad entrambe sarebbe invece cellule morte senza possibilità di discriminare tra apoptosi e necrosi. Infatti, a seguito del completamento del processo di morte cellulare, di qualsiasi natura esso sia, sia la fosfatidilserina che il DNA sono esposti a livello dello spazio extracellulare. Dopo la marcatura le popolazioni cellulari sono state filtrate e contate mediante citofluorimetria FACS (Citometro Facscalibur e software Cellquest, Becton Dickinson).

Il Trypan blue é un colorante vitale: le cellule morte si colorano di blu mentre le cellule vive sono capaci di estromettere il colorante dal citoplasma. Nell'analisi al trypan blue sono stati incubati 10 µl di trypan blue con un identico volume di sospensione di cellule U87 per 2 minuti. Successivamente 10 µl di sospensione cellulare sono stati trasferiti in una camera di conta emocitometrica per la valutazione del numero di cellule non colorate (vitali).

PROTOCOLLO – VALUTAZIONE FACS IN VITRO DELL'APOPTOSI DI CELLULE DI GLIOMA UMANO AD ALTO GRADO U87 INDOTTA DA PROTEINA RICOMBINANTE MDA-7 E DA ASTROCITI TRANSGENICI MDA-7

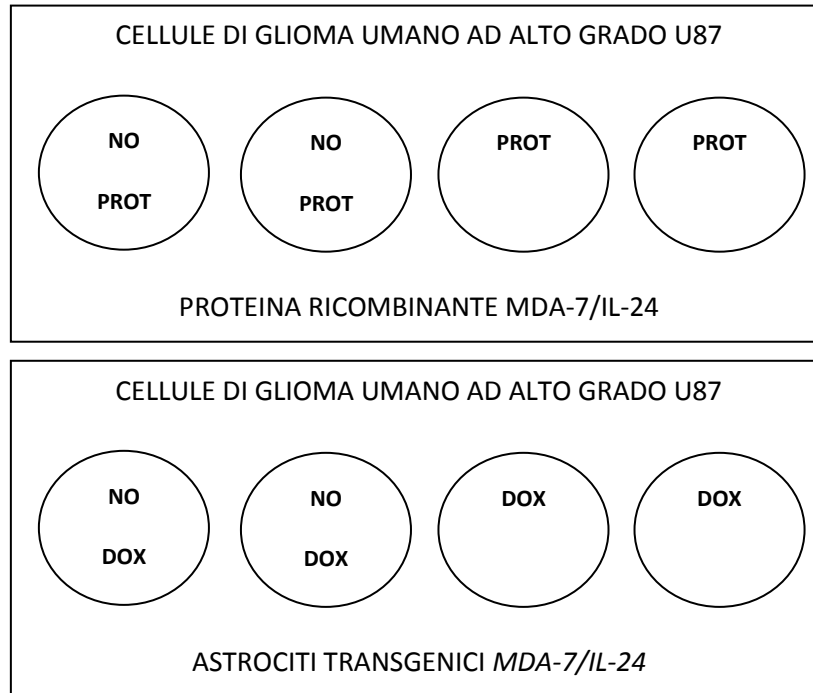


Processamento del campione per la valutazione con Annessina V-PE (BD Pharmingen)

- 1- Raccogliere il terreno (IMDM al 10%) dai pozzetti di coltura (potrebbero esservi cellule morte in sospensione nel terreno di coltura)
- 2- Risciacquare una volta con PBS

- 3- Tripsinizzare le cellule (500 μ l/pozzetto per 5 minuti)
- 4- Raccogliere le cellule tripsinizzate ed aggiungerle al terreno precedentemente raccolto
- 5- Centrifugare i campioni a 1200 giri/min per 5 minuti
- 6- Eliminare il terreno e risospendere le cellule in PBS
- 7- Ripetere il risciacquo per ulteriori 2 volte
- 8- Preparare la soluzione di marcatura
 - a. 100 μ l/campione di tampone di legame 1x dell'Annessina V-PE (BD Pharmingen)
 - b. 5 μ l/campione di Annessina V-PE (BD Pharmingen)
 - c. 5 μ l/campione di 7-Amino-actinomicina (7-AAD, BD Pharmingen)
- 9- Aggiungere 100 μ l/campione della soluzione di marcatura alla sospensione cellulare ed incubare per 15 minuti al buio
- 10- Aggiungere 400 μ l/campione di tampone di legame 1x dell'Annessina V-PE
- 11- Filtrare i campioni (Filtro cellulare in nylon da 40 μ m, BD Falcon®) e procedere alla caratterizzazione delle cellule mediante citofluorometria (Citofluorimetro Facscalibur e Software Cellquest, Becton Dickinson).

PROTOCOLLO – VALUTAZIONE IN VITRO MEDIANTE COLORAZIONE TRYPAN BLUE DELL’APOPTOSI DI CELLULE DI GLIOMA UMANO AD ALTO GRADO U87 INDOTTA DA PROTEINA RICOMBINANTE MDA-7 E DA ASTROCITI TRANSGENICI MDA-7



Processamento dei campioni per la colorazione con Trypan Blue

- 1- Eliminare il terreno di coltura dai pozzetti (IMDM al 10%)
- 2- Tripsinizzare le cellule (500 µl/pozzetto per 5 minuti)
- 3- Risospendere le cellule in IMDM al 10%, utilizzare esattamente la stessa quantità di terreno in ogni pozzetto
- 4- Raccogliere 50 µl di campione ed incubare con 50 µl di soluzione di trypan blue allo 0.4% in PBS (Trypan Blue, MP Biomedicals) per 1-2 minuti
- 5- Caricare 10 µl di campione nella camera di conta emocitometrica e contare le cellule non colorate (vitali).

PROTOCOLLO – INFORMAZIONI AGGIUNTIVE

IMDM:

- Iscove's modified DMEM (no. 10-016-CV; Cellgro®, Mediatech Inc, VA)
- 1% di L-Glutamina (no. 25-005-CI; Cellgro®, Mediatech Inc, VA)
- 1% di soluzione antibiotica/antimicotica (no. 30-004-CI; Cellgro®, Mediatech Inc, VA)

Il terreno IMDM deve essere utilizzato entro 2 settimane dalla data di preparazione.

IMDM al 10%:

- Iscove's modified DMEM (no. 10-016-CV; Cellgro®, Mediatech Inc, VA)
- 10% di Siero bovino fetale (FBS) (Gemcell, Gemini Bioproducts)
- 1% di L-Glutamina (no. 25-005-CI; Cellgro®, Mediatech Inc, VA)
- 1% di soluzione antibiotica/antimicotica (no. 30-004-CI; Cellgro®, Mediatech Inc, VA)

Il terreno IMDM al 10% deve essere utilizzato entro 2 settimane dalla data di preparazione.

IMDM-ES:

- 69% di IMDM
- 20% di FBS (Gemcell, Gemini Bioproducts)
- 1% di terreno condizionato con LIF (Leukemia Inhibitory Factor, Mount Sinai School of Medicine Stem Cell Core Facility, NY)
- 10% di terreno condizionato con CCE-Lena (Mount Sinai School of Medicine Stem Cell Core Facility, NY)
- MTG (Metil β -D-tiogalattoside, Sigma) dal pool di stoccaggio (12.6 μ l/100 ml di IMDM-ES)

Il terreno IMDM-ES deve essere utilizzato entro 2 settimane dalla data di preparazione.

Pool di stoccaggio di MTG:

- 50 μ l di MTG congelato (liquid estremamente denso, da pipettare molto lentamente)
- 450 μ l di IMDM.

Terreno SP (Stem Pro) SF (Serum Free) (100 ml):

- 1% di Glutamina
- 2% di KL (Kit Ligand, Mount Sinai School of Medicine Stem Cell Core Facility, NY)
- 1 % di Acido ascorbico (250 mg/50 ml di H₂O)
- 300 µl di MTG
- 2.6 % di supplemento Stem Pro 34 (Invitrogen, CA)
- 93.4% di terreno privo di siero StemPro®-34 (Invitrogen, CA) sino a raggiungere il volume finale

Il terreno SP deve essere utilizzato entro 7-10 giorni dalla data di preparazione.

Terreno SR (Serum Replacement):

- 74% di IMDM
- 15% di SR (Serum Replacement, Invitrogen, CA)
- 10% di Glutamina
- 1% di Acido ascorbico
- 3 µl/ml di MTG dal pool di stoccaggio MTG

Il terreno SR deve essere utilizzato entro 7-10 giorni dalla data di preparazione.

Terreno R1:

- 85% di IMDM
- 15% di SR (Serum replacement)
- 10% di L-Glutamina
- Fattore di crescita dei fibroblasti (FGF umano, R&D Systems) 10 ng/ml di soluzione finale
- Fattore di crescita epidermico (EGF ricombinante di topo, R&D) 20 ng/ml di soluzione finale

Il terreno R1 deve essere utilizzato entro 2 settimane dalla data di preparazione.

Terreno R2:

- 85% di IMDM
- 15% di SR
- 10% di L-Glutamina
- Fattore di crescita dei fibroblasti (FGF umano, R&D Systems) 10 ng/ml di soluzione finale
- Fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF-BB, R&D Systems) 10 ng/ml di soluzione finale

Il terreno R2 deve essere utilizzato entro 2 settimane dalla data di preparazione.

Tampone di trasferimento 1x:

- 14.5 g di Glicina
- 3 g di Base Trizma® (Sigma)
- 1 l di acqua deionizzata.

Latte al 5%:

- 10 g di latte in polvere
- 1 ml di Tween 20 (Sigma) in 200 ml di soluzione fisiologica tamponata con Tris (TBS) 1x
- 4 ml di Azoturo di Sodio al 1% .

TBS TWEEN 1x:

- 0.61 g di Base Trizma® (Sigma)
- 0.9 g di NaCl
- 50 µl di Tween 20
- 100 ml di acqua distillata.

Condizioni di incubazione delle cellule:

- 37°C
- 5.8% CO₂
- 90% di umidità.

Esperimenti in vivo

Xenotrapianto ortotopico di cellule di glioma ad alto grado U87

Gli esperimenti animali sono stati effettuati secondo i regolamenti dell'Animal Care and Use Committee (IACUC) del Mount Sinai Medical Center di New York, USA.

Sono stati utilizzati topi nudi atimici NCR nu/nu maschi, di 5 settimane di età, del peso di 30g (Taconic Farms, Germantown, NY). Gli animali sono stati anestetizzati mediante iniezione intraperitoneale di una soluzione di chetamina e xilazina (5mg/kg e 65mg/kg). Una piccola quantità di gel lubrificante (Surgilube®, Fougera, NY) è stata applicata sugli occhi degli per minimizzare il danno corneale durante le procedure chirurgiche. I topi anestetizzati sono stati posizionati nel tavolo stereotassico (Stoelting, IL), è stata praticata, a livello della faccia superiore del cranio, una incisione cutanea longitudinale mediana di circa 0,5 cm. Successivamente è stato praticato un foro di trapano del diametro di circa 3 mm in corrispondenza della porzione destra del cranio, a livello della sede pianificata per l'iniezione delle cellule. La sede di iniezione dello xenotrapianto è stata selezionata mediante l'ausilio di un atlante stereotassico dell'encefalo di topo (Paxinos and Franklin, 2001) in modo da effettuare l'impianto in corrispondenza del nucleo caudato-putamen a destra. Le coordinate sono state calcolate rispetto alla posizione di bregma ($x = 2 \text{ mm}$; $y = -0,5 \text{ mm}$; $z = 3 \text{ mm}$) (Figg. 12a, 12b).

È stata utilizzata una siringa Hamilton (Reno, NV) da 50 μl equipaggiata con un ago da 26 gauge e fissata al tavolo stereotassico per effettuare l'iniezione di 5×10^5 cellule di glioma umano maligno U87, ottenute dalla American Type Culture Collection (ATCC) (HTB-14™, Rockville, MD). Le cellule U87 sono state sospese in PBS alla concentrazione di $10^5/\mu\text{l}$. Prima dell'impianto la sospensione cellulare utilizzata è stata ripetutamente miscelata mediante pipettamento in modo da assicurare omogeneità di concentrazione tra le varie iniezioni

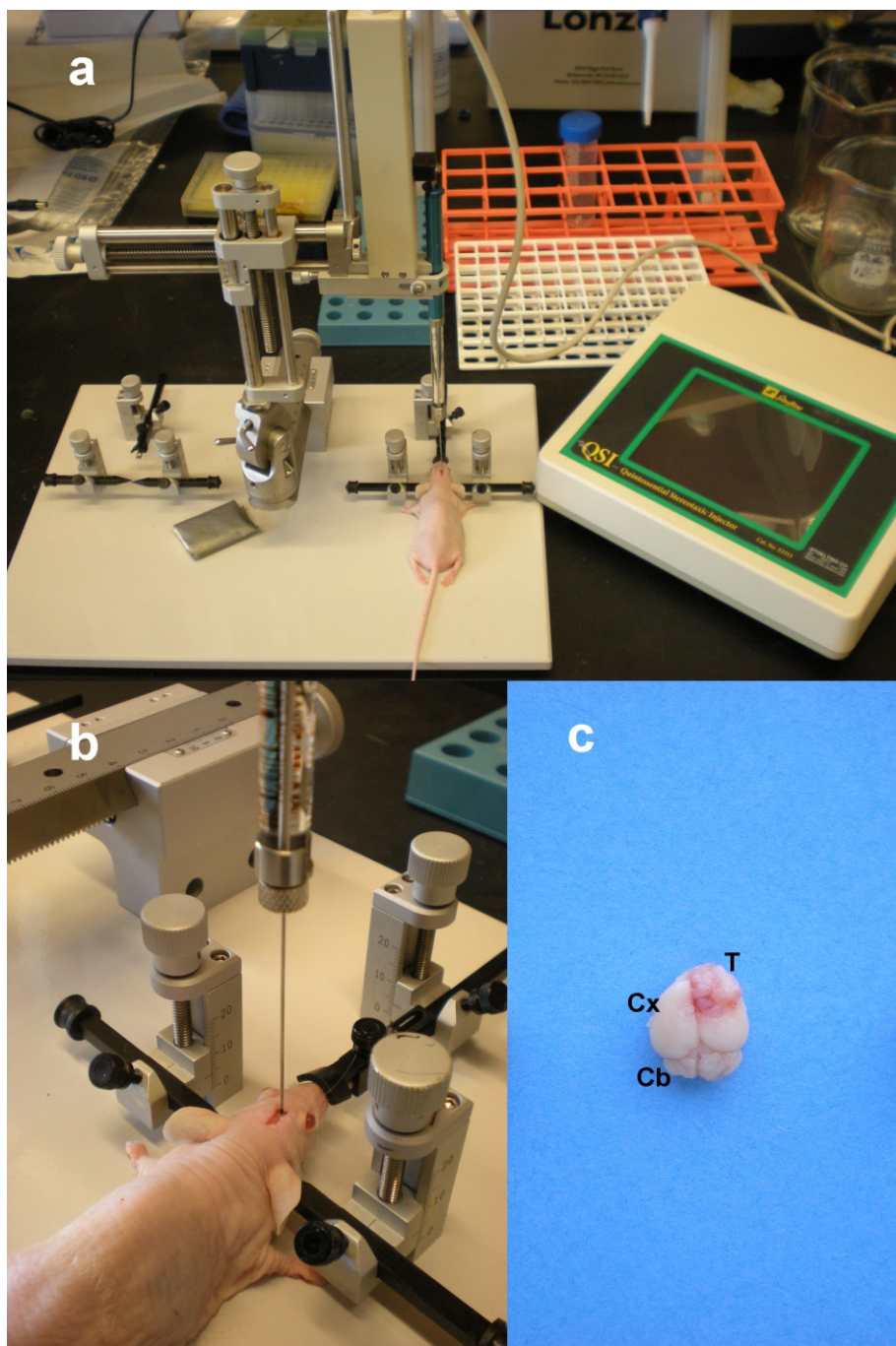


Fig. 12: (a) Il tavolo stereotassico ed il microiniettore automatico (Stoelting, IL) sono indispensabili per l’impianto sia delle cellule di glioma umano ad alto grado U87 che degli astrociti ingegnerizzati. (b) L’iniezione delle cellule viene effettuata attraverso un foro di trapano posizionato 0.5 mm posteriormente e 2 mm lateralmente al punto di repere bregma. Il bersaglio cerebrale viene raggiunto nell’emisfero di destra alla profondità di 3 mm. L’iniezione della sospensione cellulare avviene alla velocità di 1 μ l/min utilizzando una siringa Hamilton da 50 μ l con ago da 26 gauge. (c) Al termine delle procedure sperimentali gli animali vengono sacrificati e si procede al prelievo dell’encefalo. Si riconoscono gli emisferi cerebrali (Cx), quelli cerebellari (Cb) e la lesione neoplastica (T).

intracerebrali. Sono stati iniettati 5 μ l di soluzione alla velocità di 1 μ l/min mediante l'utilizzo di un microiniettore automatico (Quintessential Stereotaxic Injector, Stoelting, IL). La siringa è stata lasciata in loco per un ulteriore minuto al fine di consentire l'equilibratura delle pressioni nei tessuti circostanti l'iniezione e infine delicatamente retratta. La sutura cutanea è stata effettuata con punti interrotti utilizzando un filo Nurolon® 4-0 (Ethicon Inc, OH) e gli animali sono stati posizionati su un supporto riscaldato sino al loro risveglio.

Impianto di astrociti transgenici MDA-7/IL-24

Una settimana dopo l'impianto di cellule U87, si è proceduto all'iniezione di astrociti transgenici derivati da cellule staminali embrionali di topo, utilizzando le stesse coordinate stereotassiche. Gli astrociti sono stati sospesi in soluzione con PBS alla concentrazione di 10^5 cellule/ μ l e si è proceduto all'iniezione di 5×10^5 cellule mediante la medesima procedura descritta per l'iniezione di cellule U87.

Induzione dell'espressione del transgene MDA-7/IL-24 in vivo

Nel gruppo sperimentale, a partire da quattro giorni dopo l'impianto degli astrociti e per tutta la durata dell'esperimento, l'acqua potabile a disposizione degli animali è stata addizionata con doxiciclina (20 μ g/ml), in modo da consentire l'espressione genica di *MDA-7/IL-24*. A causa della nota fotosensibilità della doxiciclina la soluzione antibiotica è stata somministrata attraverso bottiglie rivestite in alluminio.

Valutazione dei volumi tumorali

Quattro settimane dopo l'impianto delle cellule U87 si è proceduto al sacrificio degli animali appartenenti a tutti i bracci sperimentali attraverso la somministrazione di 30 ml di soluzione di formaldeide al 10% in tampone fosfato nel ventricolo cardiaco sinistro. L'encefalo dei topi è stato prelevato in blocco ed

immerso nella stessa soluzione di formaldeide al 10% per almeno una notte a 4°C (Fig. 12c).

I campioni fissati sono stati successivamente inclusi in Tissue-Tek® O.C.T™ (Sakura, CA), congelati mediante immersione in una soluzione di ghiaccio secco e metilbutano ed infine conservati a -80°C.

Le sezioni istologiche dei preparati sono state effettuate al criostato (HM 505E, Microm), ottenendo sezioni seriate, dello spessore di 10 µm, sul piano coronale. I vetrini allestiti sono stati colorati con ematossilina-eosina e montati con Permount® (Fisher Scientific, CA).

Nel gruppo di controllo (iniezione di cellule U87) è stata considerata, per la colorazione in ematossilina-eosina, una sezione istologica ogni cinque ottenute. Le sezioni all'ematossilina-eosina che mostravano la presenza di lesioni neoplastiche sono state fotografate (Digital Sight Camera System DS-L1, Nikon) al microscopio ottico (BX51, Olympus) a basso ingrandimento (20x). Le immagini digitali sono state successivamente importate nel software ImageJ 1.42q (National Institute of Health, MD) per l'esecuzione dell'indagine morfometrica. Le aree delle sezioni istologiche occupate da tessuto neoplastico sono state delimitate considerando la stessa sezione di ogni vetrino (Fig. 13). Successivamente è stata calcolata una stima del volume tumorale utilizzando la formula: $\sum [\text{Area Neoplastica} \times \text{Spaziatura tra le Sezioni}]$ (Fig. 14). Le misure sono state effettuate da due operatori indipendenti per valutare la variabilità interosservatore.

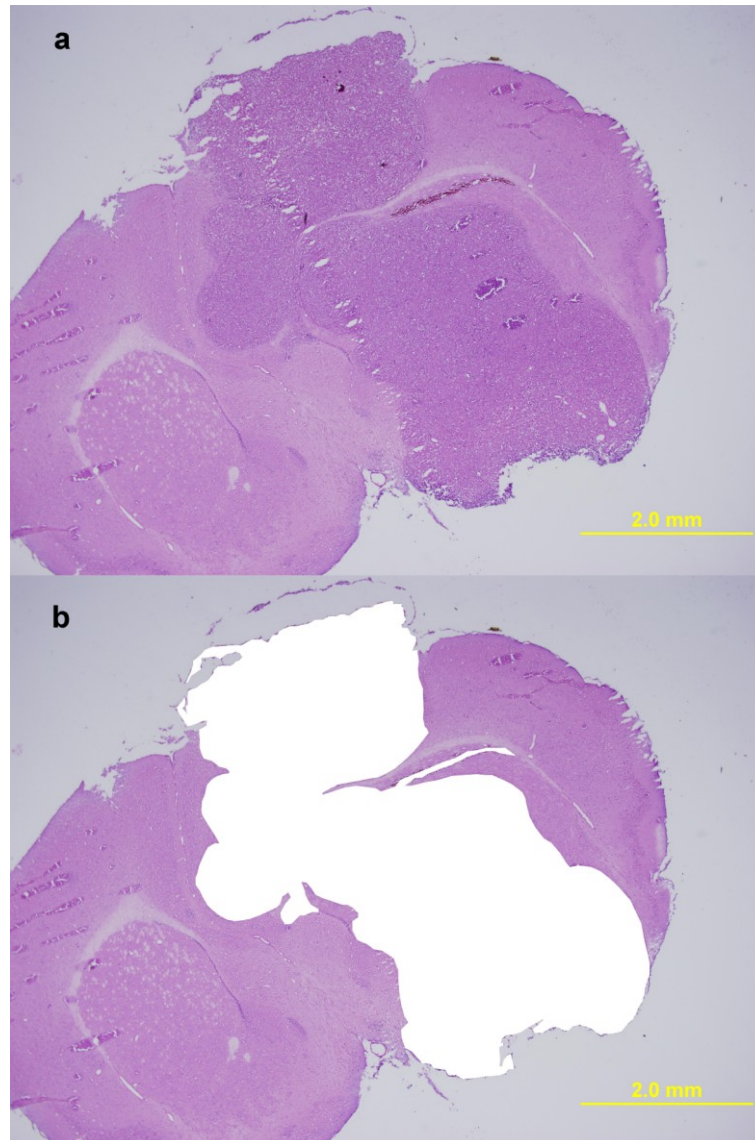


Fig. 13: (a) Le sezioni istologiche ottenute vengono fotografate a basso ingrandimento (20x). **(b)** L'area occupata dalla neoplasia viene delimitata e misurata utilizzando un software dedicato (ImageJ 1.42q, NIH).

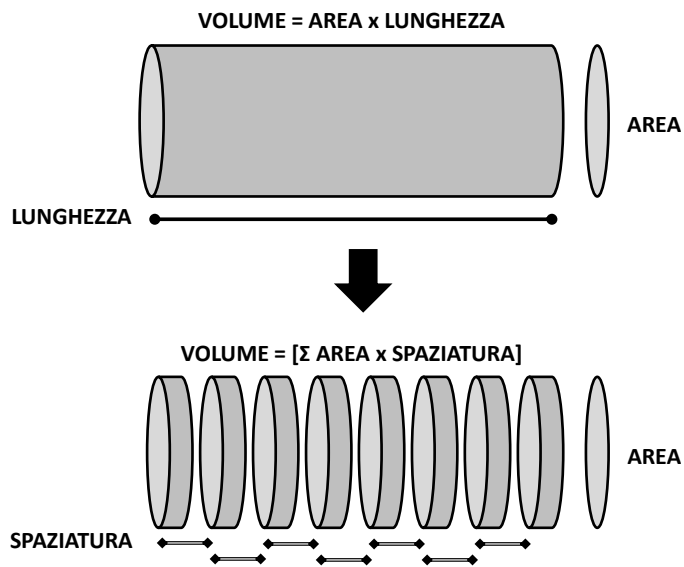


Fig. 14: Il volume delle lesioni neoplastiche viene stimato sulla base delle aree misurate sui vetrini e della spaziatura, costante, esistente tra le varie sezioni istologiche.

RISULTATI

Esperimenti in vitro

Coltura delle cellule staminali embrionali murine e loro differenziazione in astrociti

La progressiva differenziazione degli astrociti a partire dalle cellule staminali embrionali di topo è stata documentata, dal punto di vista morfologico, al microscopio ottico, sia in condizioni di luce diretta che in contrasto di fase. Al momento della semina delle cellule staminali embrionali murine sulle piastre di coltura contenenti mEF esse apparivano come elementi cellulari di aspetto rotondeggiante del diametro di circa 30-40 μm che fluttuavano liberamente nel terreno di coltura (Fig. 15).

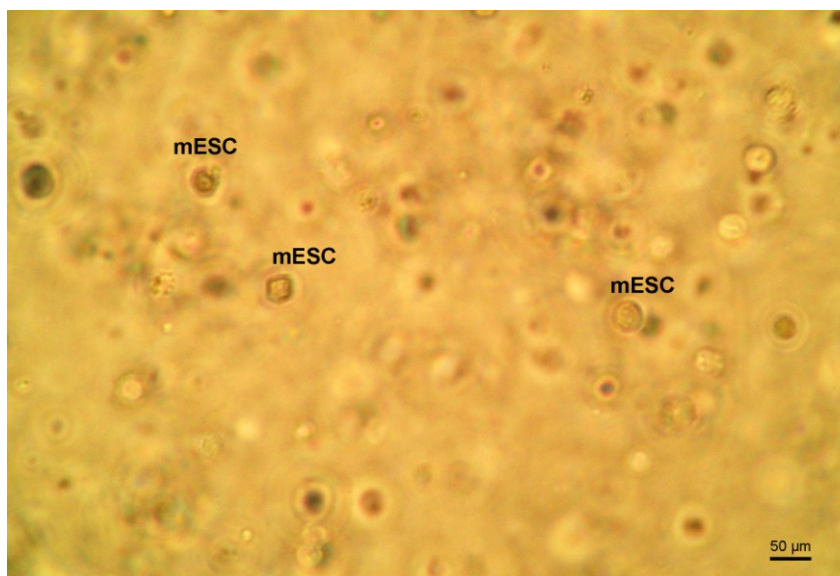


Fig. 15: Cellule staminali embrionali di topo (mESC) in sospensione nel terreno di coltura subito dopo la semina. Microscopia ottica, 100x.

L'osservazione delle stesse cellule a 2 giorni dalla semina metteva in evidenza la loro adesione alla superficie della piastra di coltura e la loro organizzazione in colonie cellulari, nell'ambito di una superficie caratterizzata dalla presenza di fibroblasti murini embrionali (Fig. 16a). Questi aspetti morfologici erano confermati all'osservazione in contrasto di fase (Fig. 16b).

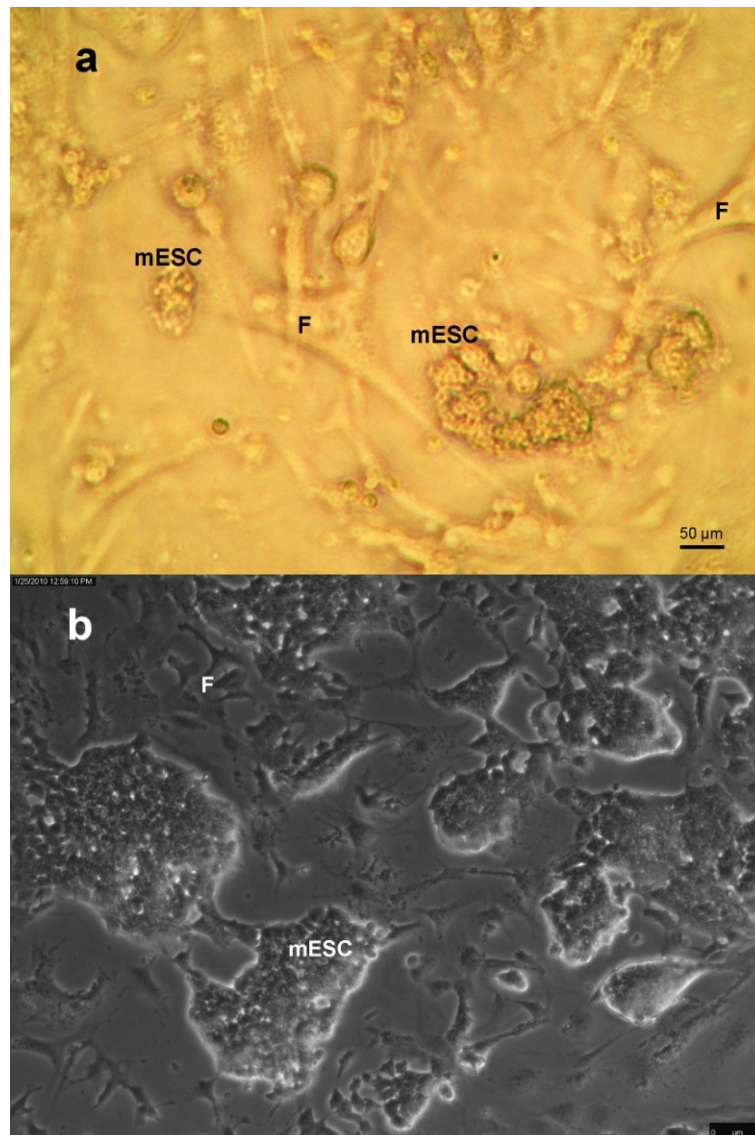


Fig. 16: Cellule staminali embrionali di topo (mESC) dopo due giorni dalla semina sui fibroblasti murini (F). Si osserva l'iniziale crescita di colonie cellulari. **(a)** Microscopia ottica, 100x. **(b)** Microscopia a contrasto di fase, 100x.

A distanza di 5 giorni dalla semina, le colonie cellulari occupavano la gran parte della piastra di coltura divenendo confluenti, una condizione ottimale per il loro trasferimento in nuove piastre di coltura prive di substrato (Figg. 17a, 17b). Tale reperto era osservato costantemente durante 2-3 passaggi in coltura, prima di procedere alla semina per la formazione dei corpi embrionali.

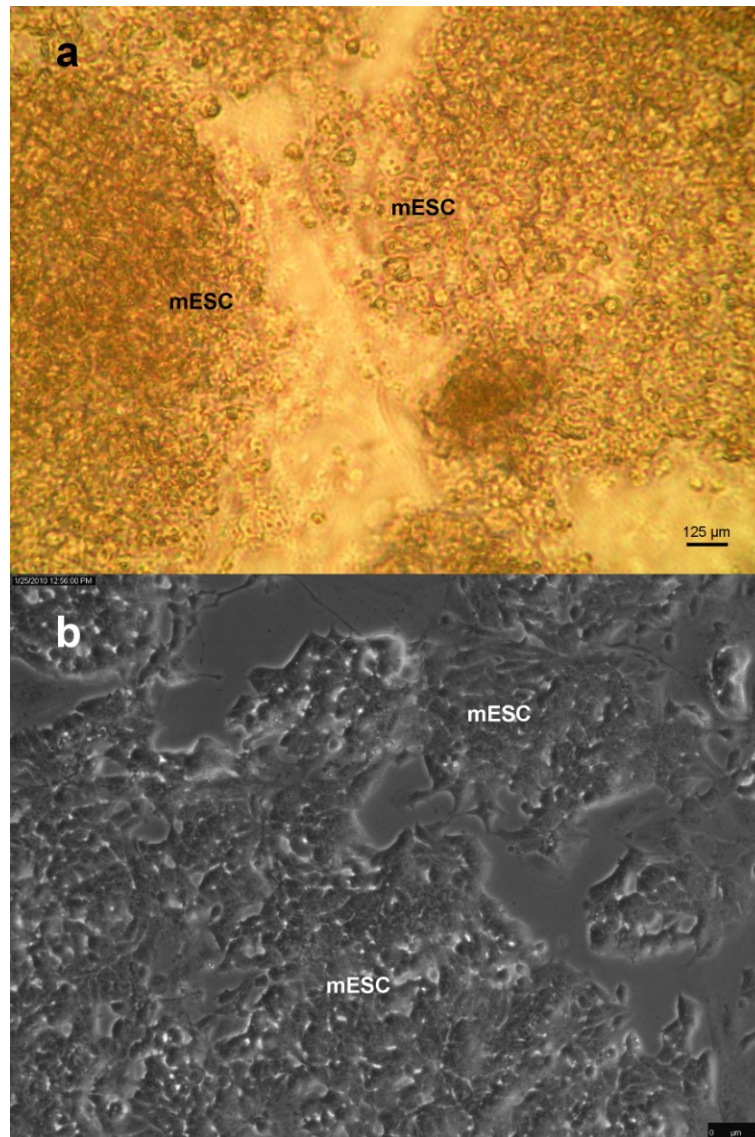


Fig. 17: Cellule staminali embrionali di topo (mESC) a 5 giorni dalla semina su terreno di coltura con substrato. Le colonie sono ormai confluenti e possono essere trasferite su piastre di coltura non rivestite di gelatina e prive di substrato. **(a)** Microscopia ottica, 40x. **(b)** Microscopia a contrasto di fase, 100x.

A 2 giorni dalla semina delle mESC in piastre di Petri in condizioni di crescita in sospensione, non essendo possibile l'adesione delle cellule al fondo della piastra, si osservava la formazione di corpi embrionali di piccole dimensioni. Questi erano costituiti da aggregati cellulari di forma rotondeggiante che fluttuavano liberamente nel terreno di coltura. In questa fase il contatto tra i diversi aggregati cellulari consentiva lo scambio di porzioni delle popolazioni cellulari tra i diversi corpi embrionali (Fig. 18).

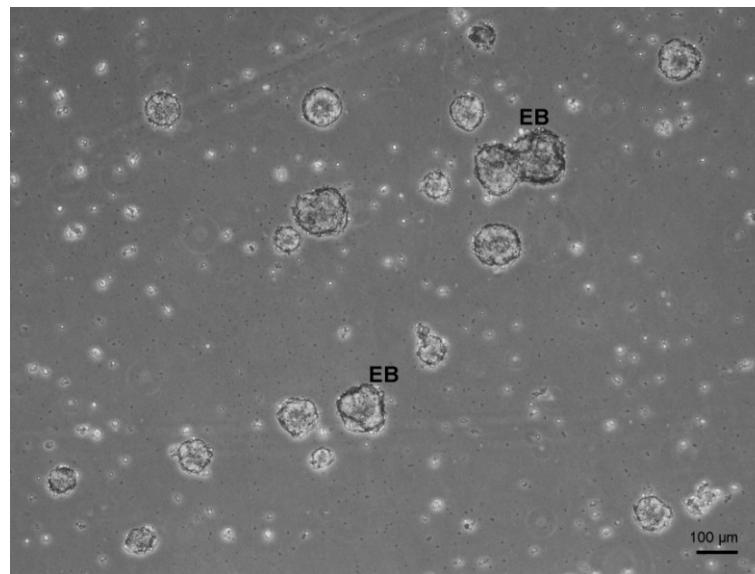


Fig. 18: Corpi embrionali (EB) in sospensione a 3 giorni dalla semina in piastre di Petri non rivestite di gelatina. Le cellule appaiono aggregate in formazioni sferoidali che talora vengono a contatto, consentendo lo scambio delle popolazioni cellulari tra i vari corpi embrionali. Microscopia a contrasto di fase, 50x.

A seguito della crescita sotto forma di corpi embrionali, le cellule staminali embrionali, esposte ad un adeguato terreno di coltura in piastre rivestite di gelatina, che ne consentisse la loro adesione al fondo, continuavano la loro crescita in colonie iniziando il processo differenziativo in astrociti. Tale evoluzione era testimoniata dalla comparsa, nell'ambito delle colonie cellulari dalla morfologia già descritta, di elementi di forma allungata, con propaggini citoplasmatiche che gli conferivano una forma variabile. Accanto a cellule di aspetto decisamente globoso si osservavano cellule di aspetto allungato e triangolare. In ogni caso gli astrociti in via di differenziazione offrivano a

considerare la presenza costante di fini prolungamenti del loro citoplasma (Figg. 19a, 19b).

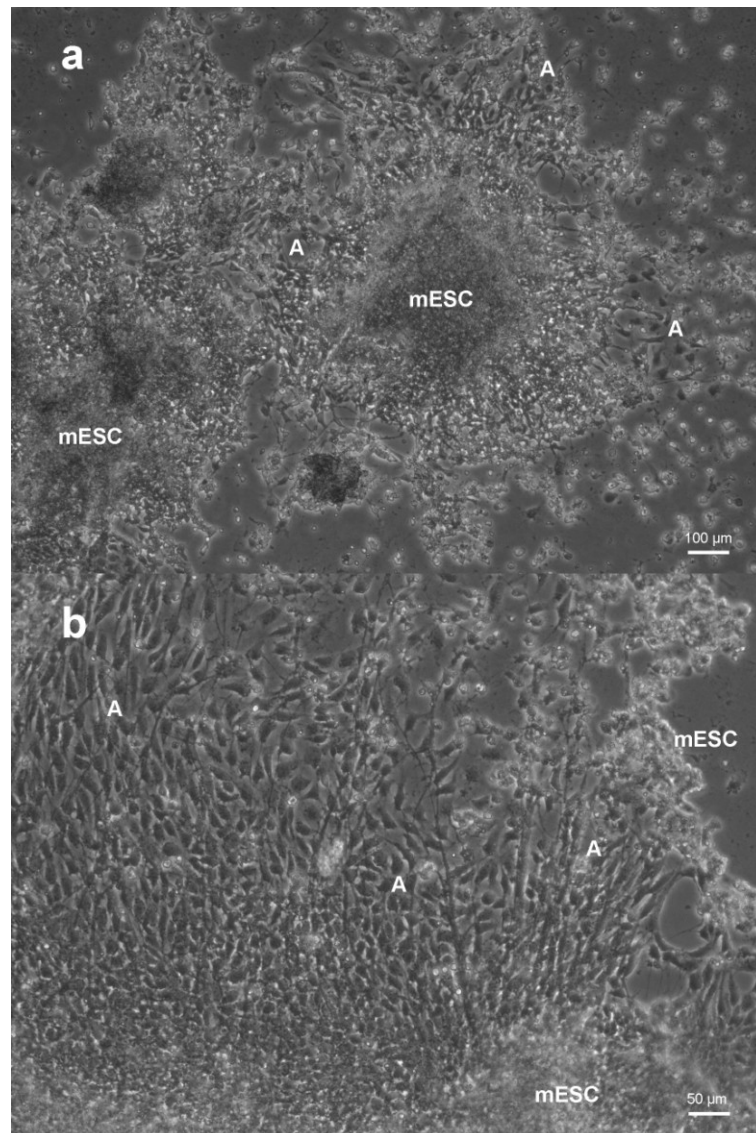


Fig. 19: Immagini di colonie di cellule staminali embrionali di topo (mESC) ottenute a distanza di 4 giorni dalla semina su piastre di Petri rivestite di gelatina con terreno R2. Le mESC mostrano progressiva differenziazione in astrociti (A), dalla morfologia allungata. Microscopia a contrasto di fase, **(a)** 50x, **(b)** 100x.

Un aspetto comunemente osservato è stata la variabilità della proporzione tra elementi staminali ed astrociti. Sebbene la documentazione fotografica sia stata raccolta su popolazioni che si trovavano teoricamente allo stesso stadio di differenziazione, sulla base dei tempi e delle modalità di coltura, è stato possibile

osservare dei campi in cui le colonie confluenti di cellule staminali embrionali costituivano la componente cellulare preponderante, al pari di campi in cui gli astrociti costituivano la maggior parte delle cellule presenti (Figg. 20a, 20b).

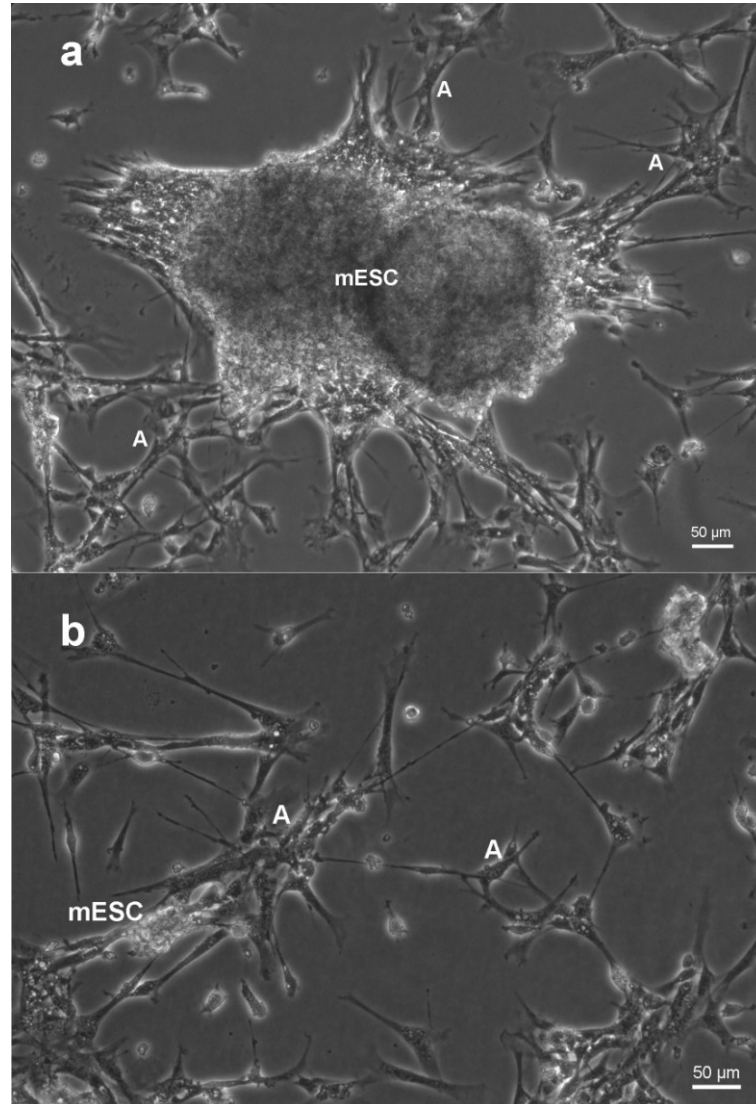


Fig. 20: Colture di cellule staminali embrionali di topo a distanza di 4 giorni dalla semina con terreno R2. La morfologia delle colonie dipende dalle proporzioni tra la popolazione astrocitaria (A) in via di differenziazione e le colonie di cellule ancora indifferenziate (mESC). In **(a)** gli astrociti compaiono come ramificazioni dalla colonia principale delle cellule indifferenziate. In **(b)** gli astrociti (A) hanno quasi completamente sostituito le colonie di cellule staminali embrionali (mESC) e mostrano la loro tipica morfologia fusata con sottili propaggini cellulari. Microscopia a contrasto di fase, 100x.

Nei casi in cui le cellule staminali continuavano ad essere presenti in grande quantità, gli astrociti, già riconoscibili per la loro forma allungata e per la

presenza di propaggini citoplasmatiche che terminavano con sottili diramazioni, si trovavano all'interfaccia tra le colonie di cellule staminali ed il terreno di coltura circostante (Fig. 20a). Tale aspetto diveniva ulteriormente evidente mano a mano che gli astrociti andavano a costituire la componente cellulare preponderante, dando luogo a gruppi di cellule con numerose propaggini citoplasmatiche, che conferivano alle colonie nel loro insieme un aspetto notevolmente ramificato (Fig. 20b).

Caratterizzazione degli astrociti ottenuti da mESC transgeniche

L'osservazione al microscopio a fluorescenza delle cellule in coltura ha confermato la loro natura astrocitaria. In particolare, la colorazione con marcatore fluorescente per GFAP ha messo in evidenza una spiccata positività a tale marcatore astrocitario a livello del citoplasma delle cellule in coltura (Fig. 21a).

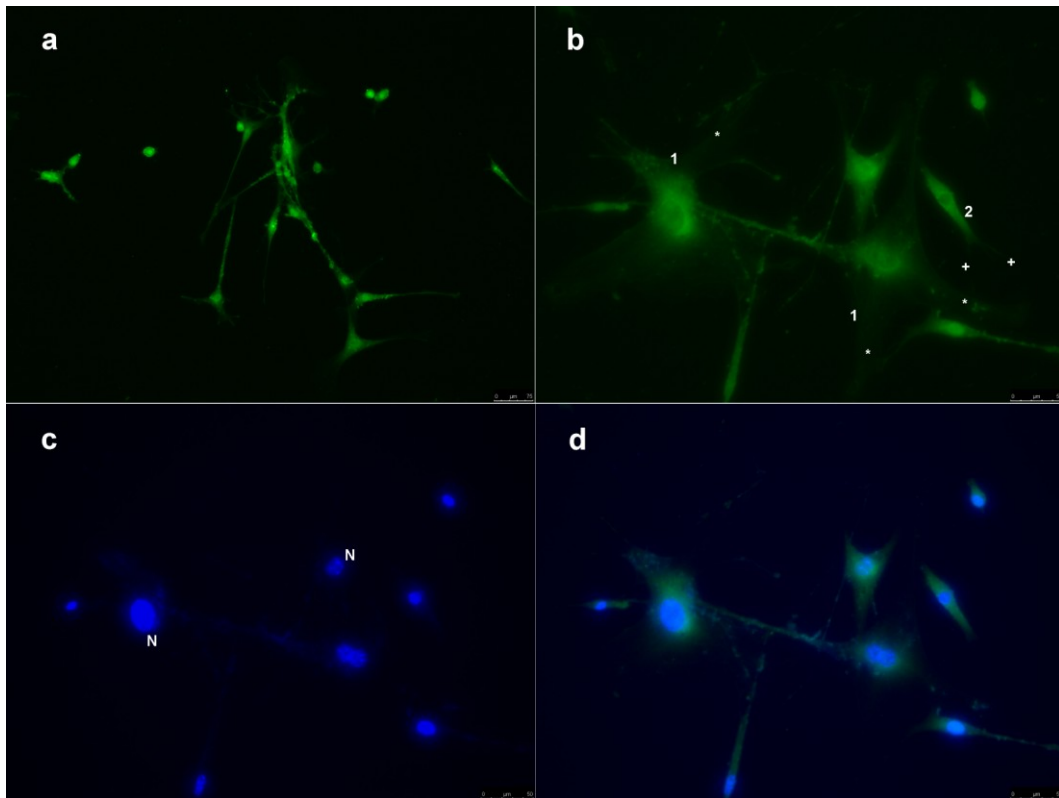


Fig. 21: **(a)** La differenziazione astrocitaria delle cellule staminali embrionali di topo transgeniche *MDA-7/IL-24* è confermata dall'intensa positività per GFAP (in verde) all'immunofluorescenza. **(b)** A maggiore ingrandimento, sono visibili maggiori dettagli morfologici. Alcune cellule (1) mostrano dei sottili processi citoplasmatici (*) che gli conferiscono il tipico aspetto stellato suggestivo di astrociti di tipo 1. Altre cellule (2) morfologia più compatta e sottilissime propaggini citoplasmatiche (+) suggestivi di astrociti di tipo 2. **(c)** La controcolorazione del preparato con DAPI (blu) mette in evidenza l'intensa positività dei nuclei. **(d)** La fusione digitale delle immagini (b) e (c) conferma la colocalizzazione di nuclei DAPI positivi (blu) nell'ambito di cellule a citoplasma GFAP positivo (verde). Microscopia a fluorescenza, **(a)** 100x, **(b-d)** 200x.

Lo studio ad alto ingrandimento ha consentito, così come era avvenuto all'osservazione con luce diretta, di discriminare la morfologia cellulare tipica

degli astrociti di tipo 1, più allungati, da quelli di tipo 2, dal corpo cellulare più compatto (Fig. 21b). La controcolorazione dei nuclei cellulari con DAPI (Fig. 21c) e la fusione delle immagini (Fig. 21d) ha confermato trattarsi di elementi cellulari piuttosto che di artefatti della colorazione in fluorescenza. Gli astrociti presentavano una positività omogenea per GFAP, finemente distribuita su tutto il corpo cellulare.

La positività per GFAP è stata altresì confermata dalla citofluorimetria per tale marcatore. Le cellule marcate con anticorpo anti-GFAP di topo, rivelato da anticorpo anti-Ig murina coniugato con APC (allofococianina), hanno mostrato una positività superiore a quella delle cellule marcate con Ig aspecifiche ed a quelle non colorate (Fig. 22a). L'analisi quantitativa dei risultati ha confermato una positività 7 volte superiore rispetto al gruppo di controllo (Fig. 22b).

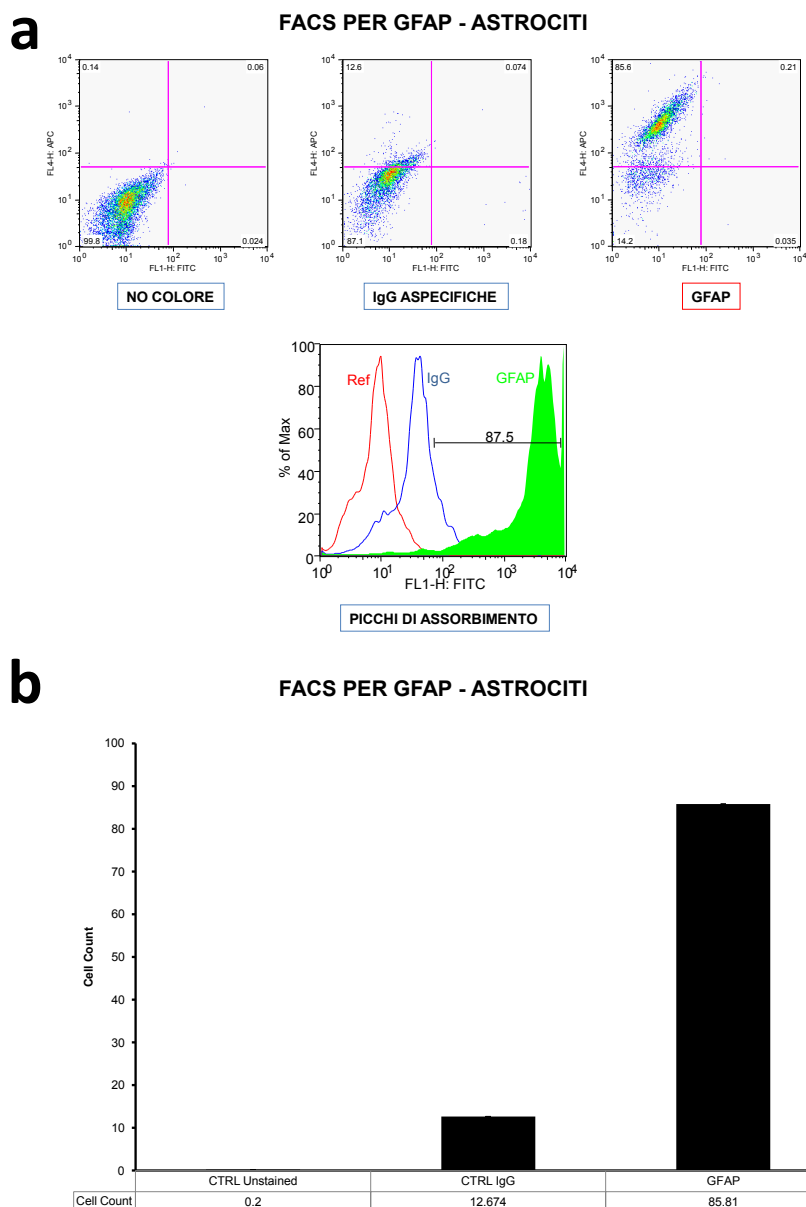


Fig. 22: (a) La citofluorimetria (FACS) conferma la positività delle popolazioni astrocitarie transgeniche per il marcatore GFAP. **(b)** L'analisi quantitativa ha escluso la possibilità di una falsa positività, documentando valori misurati di circa 7 volte superiori a quelli ottenuti con i marcatori di controllo (nessun rivelatore fluorescente o IgG aspecifiche).

Analisi dell'espressione genica indotta da doxiciclina in astrociti transgenici MDA-7/IL-24

La marcatura degli astrociti con anticorpi anti-MDA-7/IL-24 coniugati con rivelatori fluorescenti ha consentito di confermare il mantenimento della capacità di esprimere il transgene *MDA-7/IL-24*. Nel gruppo di controllo l'utilizzo di Ig aspecifiche non si è accompagnato ad alcun segnale fluorescente, escludendo la presenza di possibili artefatti (Fig. 23a).

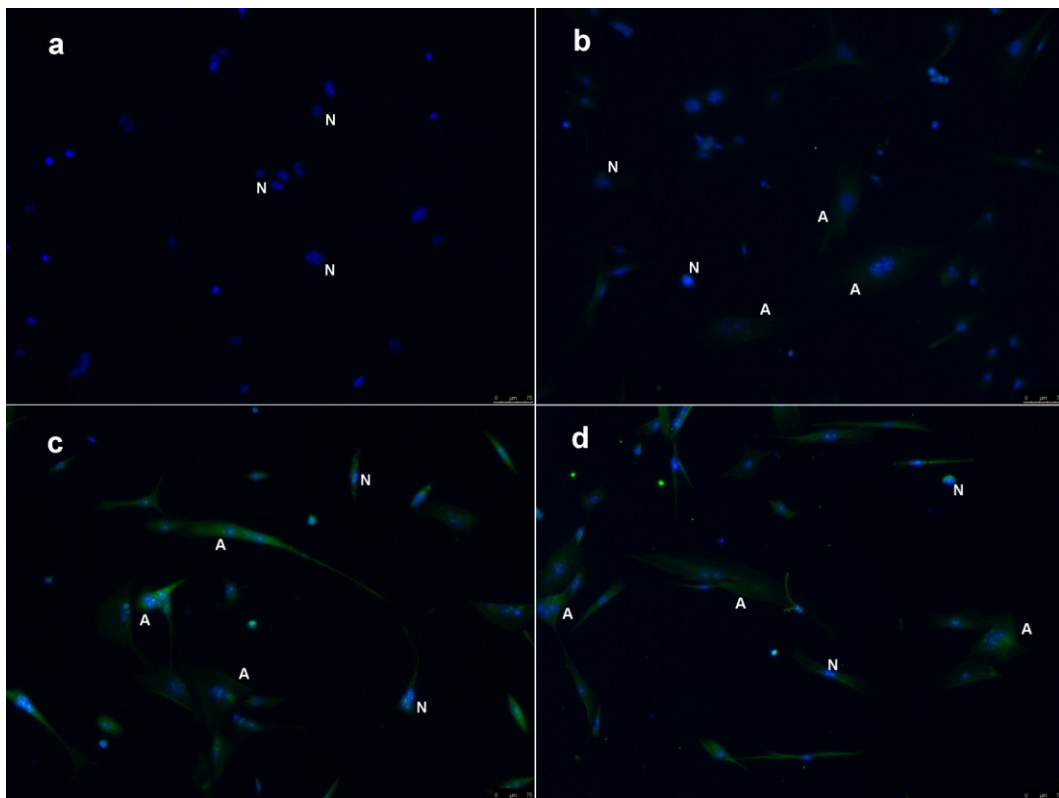


Fig. 23: Coltura di astrociti differenziati a partire da cellule staminali embrionali di topo transgeniche *MDA-7/IL-24*. L'espressione del transgene è di tipo condizionale, attivata dalla presenza di doxiciclina. La metodica di immunofluorescenza utilizzata si avvale di un marcatore fluorescente verde coniugato con anticorpi anti-MDA-7 e della colorazione dei nuclei con DAPI (blu). Nel gruppo di controllo, in cui sono state utilizzate Ig aspecifiche (a), non si osserva alcun segnale fluorescente verde. Sono evidenti solo i nuclei (N) colorati in blu. (b) Popolazioni astrocitarie (A) non esposte alla doxiciclina mostrano una debolissima positività anticorpale anti-MDA-7, come confermato dagli aloni citoplasmatici in verde. La controcolorazione con DAPI evienzia bene la colocalizzazione dei nuclei cellulari (N). (c, d) Dopo incubazione con doxiciclina, gli astrociti (A) mostrano una spiccata positività citoplasmatica (in verde) per MDA-7 che si accompagna alla colocalizzazione dei nuclei (N) evidenziati dal DAPI (in blu). Microscopia a fluorescenza, 200x.

Anche nel secondo gruppo di controllo, costituito da astrociti marcati con anticorpi anti-MDA-7/IL-24 ma non sottoposti al trattamento con doxiciclina, la colorazione del citoplasma da parte del marcatore fluorescente era minima (Fig. 23b). Al contrario, nel gruppo marcato con anticorpi anti-MDA-7/IL-24 trattato con doxiciclina era apprezzabile una significativa positività alla microscopia a fluorescenza (Fig. 23c, 23d). L'espressione di MDA-7/IL-24 è stata ulteriormente confermata mediante metodiche di biologia molecolare.

Utilizzando la metodica del western blotting, sebbene fosse presente una debole positività in assenza della somministrazione di doxiciclina, l'esposizione delle cellule a tale antibiotico era in grado di indurre l'espressione genica in modo apprezzabile (Fig. 24).

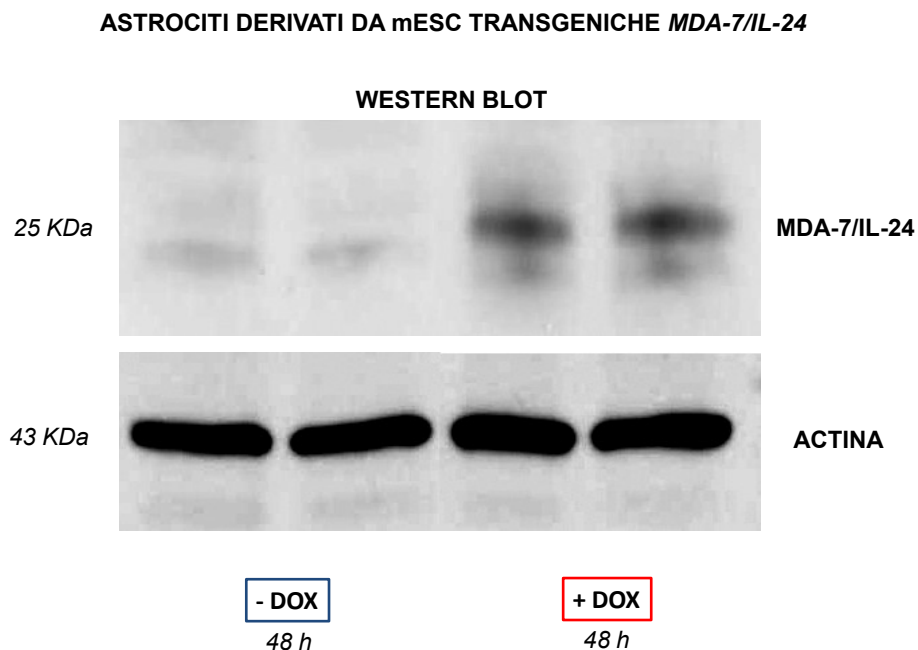


Fig. 24: L'analisi della sintesi proteica mediante tecnica del western blot mostra la produzione di MDA-7/IL-24 in risposta alla somministrazione di doxiciclina. Una debole positività alla proteina è documentata anche in assenza della somministrazione di doxiciclina. La banda di controllo relativa all'actina risulta omogenea nei due gruppi sperimentali.

I dati ottenuti mediante la citofluorimetria hanno evidenziato la negatività nei gruppi di controllo, sia senza utilizzo del marcatore che a seguito dell'utilizzo di Ig

aspecifiche (Figg. 25a, 25b). La marcatura con anticorpi anti-MDA-7/IL-24 ha mostrato, in accordo con quanto messo in evidenza con le metodiche sopracitate, una lieve espressione del transgene in condizioni basali, notevolmente incrementata a seguito della somministrazione di doxiciclina (Figg. 25a, 25b).

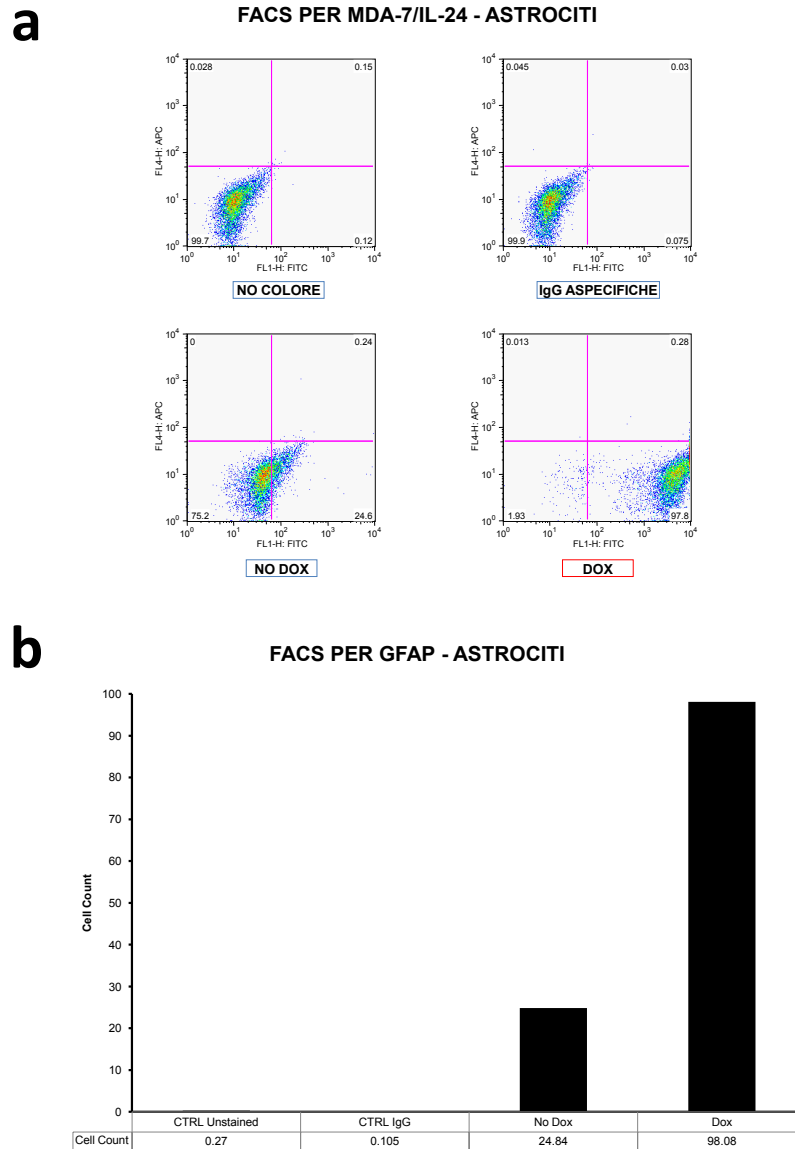


Fig. 25: (a) La citofluorimetria dimostra l'assenza di segnale nei gruppi di controllo (nessun rivelatore fluorescente o IgG aspecifiche). L'utilizzo di IgG anti-MDA-7 marcate con FITC dimostra una minima positività nella popolazione astrocitaria non esposta a doxiciclina. A seguito della somministrazione dell'antibiotico la positività per MDA-7 diviene netta. (b) La valutazione quantitativa conferma le osservazioni già effettuate sul grafico a dispersione.

Analisi della migrazione degli astrociti transgenici MDA-7/IL-24

L'analisi della migrazione degli astrociti ha messo in evidenza risultati comparabili sia utilizzando cellule di glioblastoma U87 e conteggiando gli astrociti rimasti all'interno della camera semipermeabile del sistema Transwell® che utilizzando cellule U251 e conteggiando gli astrociti adesi alla faccia inferiore dei supporti semipermeabili.

La migrazione degli astrociti verso cellule U87 in coltura è risultata essere minima a 2 ore dalla semina, sia nel gruppo di controllo che nel gruppo di studio: 12,5% e 15% di cellule migrate rispettivamente. A 36 ore di distanza, invece, mentre nel gruppo di controllo erano migrate il 17,1% delle cellule, nel gruppo di studio tale valore ammontava a 32,9% (Fig. 26a).

Utilizzando cellule di glioblastoma U251, a 36 ore le cellule migrate nel gruppo di studio erano il 30% circa in più rispetto al gruppo di controllo. L'osservazione a 72 ore mostrava un ulteriore aumento di tale proporzione: nel gruppo di studio la migrazione era di 5 volte superiore (Fig. 26b).

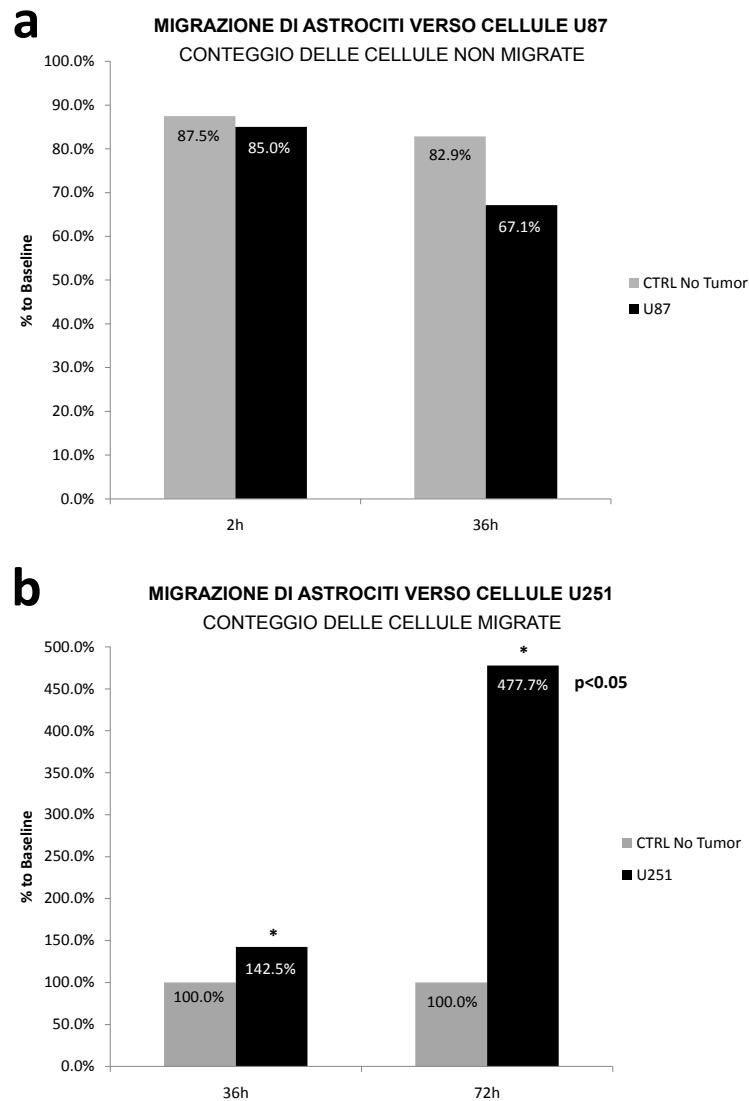


Fig. 26: L'analisi della migrazione ha documentato la motilità degli astrociti verso cellule di GBM U87 e U251. **(a)** Nel primo gruppo sperimentale, la popolazione astrocitaria non ha mostrato apprezzabile motilità nelle fasi precoci dell'esperimento mentre ha mostrato una deplezione di circa il 20% dopo 36h di osservazione rispetto ai gruppi di controllo, non esposti alle cellule neoplastiche. **(b)** Nel secondo gruppo sperimentale, nonostante una minima migrazione astrocitaria presente nei gruppi di controllo, l'esposizione alle cellule di GBM incrementava notevolmente la motilità degli astrociti. I valori sono significativamente elevati dopo 72h di osservazione ($p < 0.05$).

Valutazione dell'apoptosi di cellule di glioma ad alto grado U87

La valutazione dell'apoptosi delle cellule di glioma ad alto grado U87, misurata in base alla positività all'Annessina V alla citofluorimetria, ha messo in evidenza l'assenza di un effetto apoptotico apprezzabile della proteina ricombinante MDA-7/IL-24 (Figg. 27a, 27b).

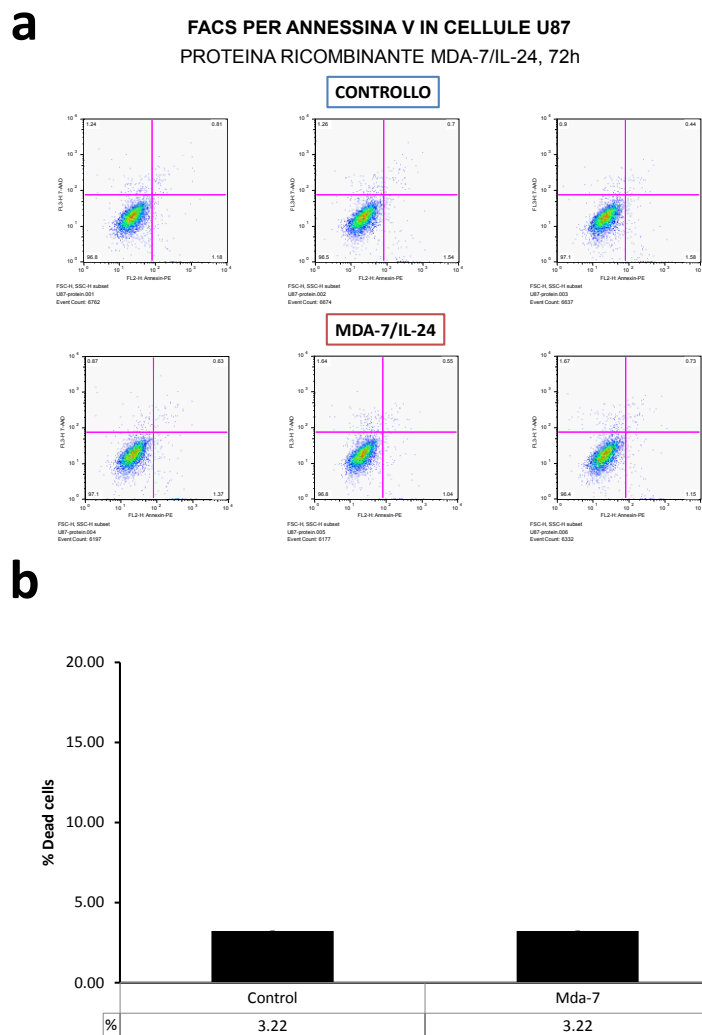


Fig. 27: Analisi dell'apoptosi nelle cellule di GBM U87 con metodica FACS per il marcatore Annessina V. **(a)** Il grafico a dispersione non mostra evidenti differenze tra i dati relativi al gruppo di controllo e quello in cui è stata somministrata la proteina ricombinante MDA-7/IL-24. **(b)** L'analisi quantitativa conferma l'assenza di effetto apoptotico della proteina ricombinante sulle cellule U87.

In condizioni di co-cultura con astrociti transgenici per 48 ore, invece, nel gruppo esposto alla doxiciclina la percentuale di cellule apoptotiche raggiungeva valori prossimi al 15%. Tuttavia, anche nel gruppo in cui non era stata somministrata la tetraciclina, era presente una percentuale di cellule apoptotiche vicina al 9% (Figg. 28a, 28b).

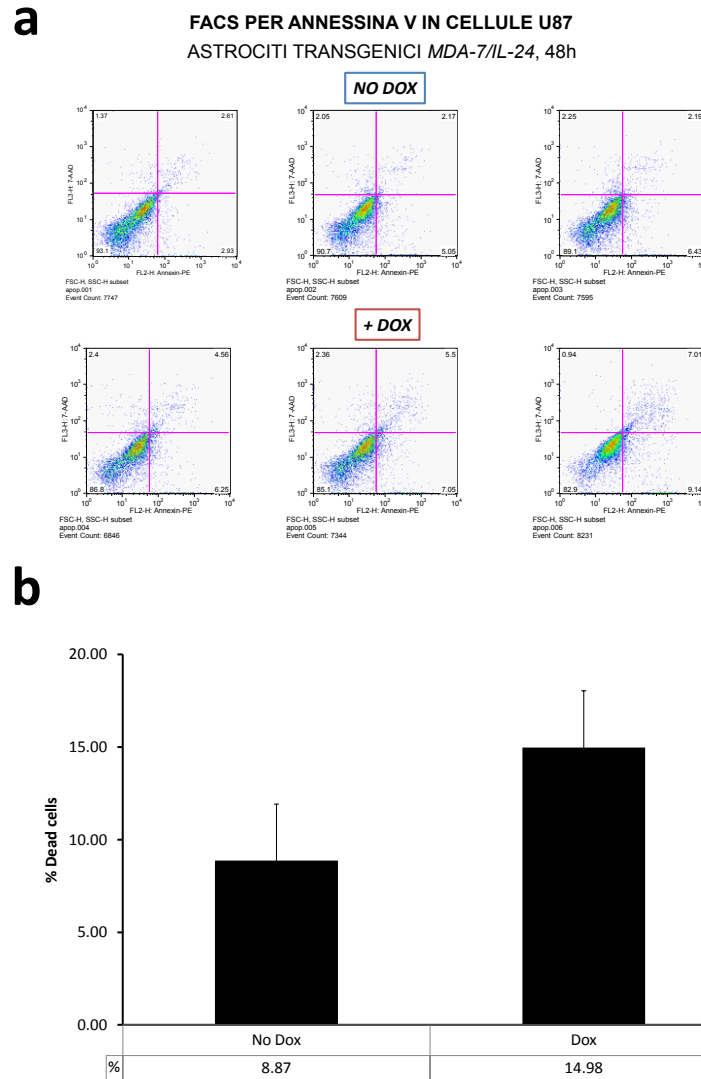


Fig. 28: Analisi dell'apoptosi nelle cellule di GBM U87 con metodica FACS per il marcatore Annessina V. **(a)** Il grafico a dispersione evidenzia una maggiore quota di apoptosi nel gruppo sperimentale trattato con astrociti transgenici MDA-7/IL-24 in presenza di doxiciclina. **(b)** La quantificazione delle discrepanze conferma una tendenza verso l'apoptosi a seguito della somministrazione di doxiciclina, sebbene non significativa.

La metodica del trypan blue ha confermato l'inefficacia della proteina ricombinante MDA-7/IL-24 nell'indurre l'apoptosi di cellule U87 (Fig. 29a). Tuttavia, l'utilizzo degli astrociti transgenici ha messo in evidenza la possibilità di indurre apoptosi nel 22% circa delle cellule, un valore risultato essere statisticamente significativo (Fig. 29b).

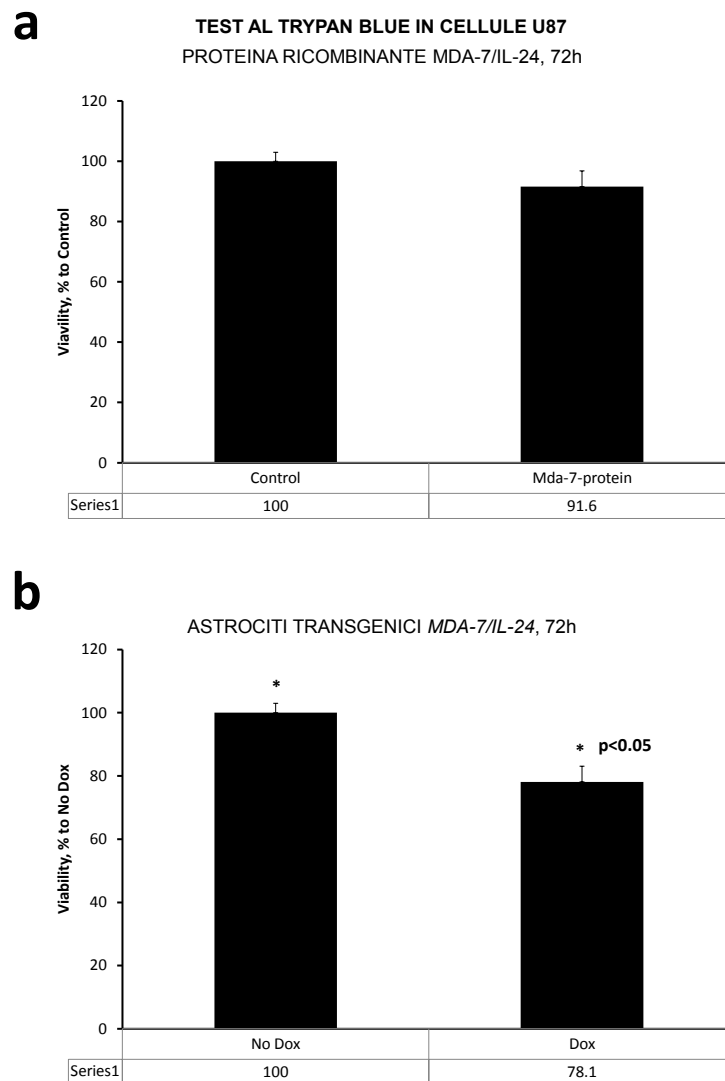


Fig. 29: Analisi dell'apoptosi nelle cellule di GBM U87 con test al Trypan blue. **(a)** La somministrazione della proteina ricombinante MDA-7/IL-24 non produce un effetto apoptotico rilevante. **(b)** L'utilizzo degli astrociti transgenici *MDA-7/IL-24* provoca la diminuzione della vitalità cellulare statisticamente significativa.

Esperimenti in vivo

L'iniezione delle cellule di glioma umano ad alto grado U87 (Fig. 30a) ha causato in tutti gli animali da esperimento la crescita di una lesione neoplastica a livello dei nuclei caudato-putamen.

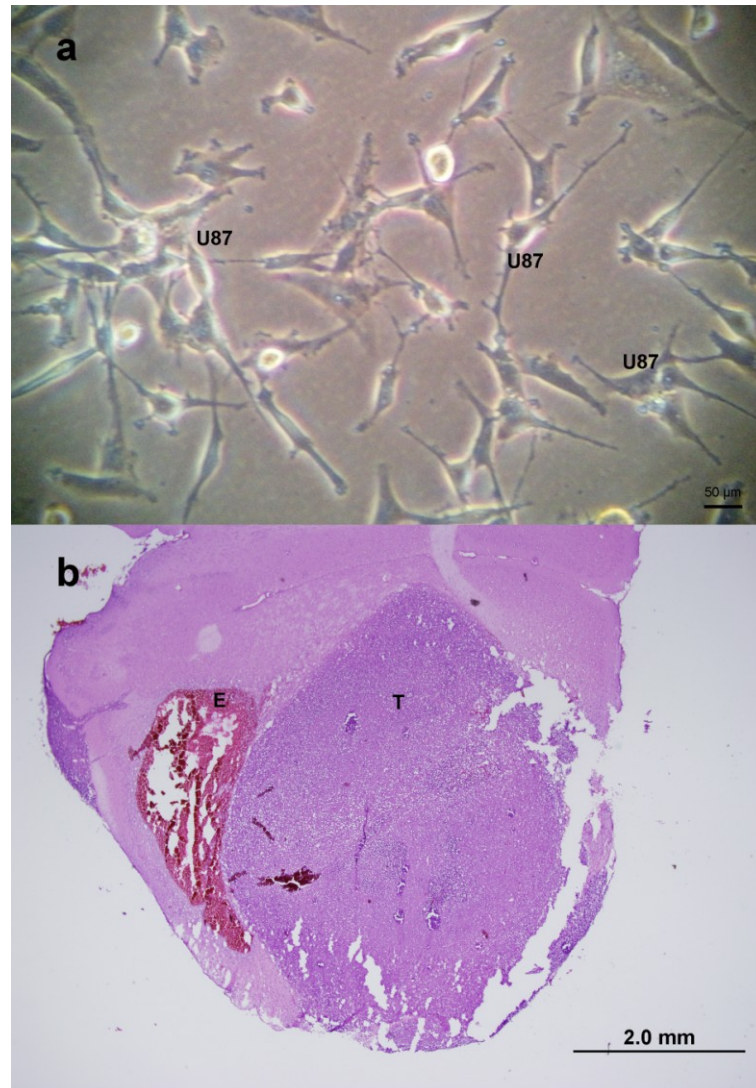


Fig. 30: (a) Le cellule di GBM umano U87 vengono mantenute in coltura in piastre a 6 pozzetti. La crescita avviene in colonie che tendono a divenire confluenti e le cellule presentano il tipico aspetto fusiforme. Microscopia ottica, 100x. (b) Le sezioni istologiche ottenute dopo il sacrificio degli animali sottoposti allo xenotrapianto di cellule U87 mostrano i tipici aspetti istologici del GBM. Si riconosce la massa neoplastica costituita da elementi cellulari polimorfi (T) accompagnata da aree di necrosi emorragica (E). Microscopia ottica, 20x.

La morfologia delle lesioni era piuttosto omogenea nei vari casi esaminati ed era caratterizzata dalla presenza di lesioni ad alta cellularità che sovvertivano il parenchima cerebrale normale. Tali processi espansivi risultavano generalmente ben delimitati dal tessuto nervoso circostante. Nel loro contesto, accanto a zone di aspetto monomorfo, erano presenti ampie zone emorragiche suggestive di processi trombotici peritumorali (Fig. 30b).

Sebbene ogni braccio sperimentale fosse costituito da 10 animali, la valutazione quantitativa degli effetti terapeutici è stata effettuata su 8 animali per i due gruppi di controllo e su 6 animali per quanto riguarda il gruppo sottoposto al trattamento sperimentale. Tali differenze sono dovute alla morte prematura dei restanti animali per cause non correlabili alla ricerca in oggetto, verosimilmente per una patologia virale delle vie respiratorie (Tabb. 1-3).

La stima dei volumi delle neoplasie presenti a livello cerebrale a distanza di 4 settimane dall'iniezione di cellule di glioma umano ad alto grado U87 ha messo in evidenza, nel primo gruppo di controllo, in cui erano state iniettate solo le cellule U87, un volume neoplastico medio pari a circa 80 mm^3 , con una deviazione standard di circa 40 mm^3 . Nel gruppo di controllo la mediana era di circa 88 mm^3 con valori massimo e minimo di circa 140 mm^3 e 30 mm^3 rispettivamente (Tab. 1).

Nel secondo gruppo di controllo, in cui erano stati iniettati gli astrociti transgenici a distanza di una settimana dall'inoculazione delle cellule U87, utilizzando le medesime coordinate stereotassiche, il volume neoplastico medio era pari a circa 25 mm^3 con una deviazione standard di circa 24 mm^3 . La mediana era di circa 24 mm^3 mentre i valori massimo e minimo erano rispettivamente pari a circa 58 mm^3 ed 1 mm^3 (Tab. 2).

TOPI NU/NU, 5x10 ⁵ CELLULE U87/5 µl, 4 SETTIMANE			
N	Gruppo	NOTE	Volume stimato (mm ³)
219	Controllo	Deceduto	ND
220	Controllo	NDR	118.21
221	Controllo	NDR	140.92
222	Controllo	NDR	96.41
223	Controllo	NDR	79.41
224	Controllo	NDR	45.10
225	Controllo	Deceduto	ND
226	Controllo	NDR	37.85
227	Controllo	NDR	113.67
228	Controllo	NDR	30.50
Max			140.92
Min			30.50
Media			82.76
Mediana			87.91
Dev. St.			41.33

Tab. 1: Dettagli degli animali del gruppo di controllo.

TOPI NU/NU, 5x10 ⁵ CELLULE U87/5 µl + ASTROCITI MDA-7/IL-24, 4 SETTIMANE			
N	Gruppo	Note	Volume stimato (mm ³)
262	NO DOX	Deceduto	ND
263	NO DOX		8.12
264	NO DOX		1.36
265	NO DOX		2.64
266	NO DOX	Deceduto	ND
267	NO DOX	Deceduto	ND
268	NO DOX		40.46
269	NO DOX		58.34
270	NO DOX		39.33
271	NO DOX	Deceduto	ND
Max			58.34
Min			1.36
Media			25.04
Mediana			23.72
Dev. St.			24.08
p (t-test rispetto al CONTROLLO)			0.007

Tab. 2: Dati relativi agli animali trattati con astrociti transgenici *MDA-7/IL-24* senza somministrazione di doxiciclina. La riduzione dei volumi neoplastici è significativa rispetto al gruppo di controllo.

Nel gruppo trattato con terapia sperimentale, in cui l'inoculazione degli astrociti transgenici era stata seguita dalla somministrazione di doxiciclina, il volume medio riscontrato era pari a circa 24 mm³, con una deviazione standard di circa 49 mm³. Quest'ultima era dovuta alla presenza di un valore massimo, atipico per il campione esaminato, pari a circa 142 mm³, mentre il valore minimo osservato era pari a circa 1 mm³. Questo aspetto si rifletteva nel valore volumetrico mediano, pari a circa 4 mm³, nettamente inferiore a quello del gruppo trattato con astrociti senza somministrazione di doxiciclina (Tab. 3).

TOPI NU/NU, 5x10⁵ CELLULE U87/5 µl + ASTROCITI MDA-7/IL-24, 4 SETTIMANE			
N	Gruppo	Note	Volume stimato
251	Astro DOX	NDR	33.14
252	Astro DOX	Deceduto	ND
253	Astro DOX	NDR	142.05
254	Astro DOX	NDR	5.24
255	Astro DOX	NDR	1.47
256	Astro DOX	Deceduto	ND
257	Astro DOX	NDR	3.30
258	Astro DOX	NDR	0.98
259	Astro DOX	NDR	3.57
260	Astro DOX	NDR	3.94
Max			142.05
Min			0.98
Media			24.21
Mediana			3.76
Dev. St.			48.78
p (t-test rispetto al CONTROLLO)			0.022
p (t-test rispetto a NODOX)			0.967

Tab. 3: Dati relativi agli animali trattati con astrociti transgenici *MDA-7/IL-24* con somministrazione di doxiciclina. Non sono evidenti significative riduzioni volumetriche delle neoplasie rispetto al gruppo non trattato con doxiciclina. Si conferma la significatività della riduzione dei volumi neoplastici rispetto al gruppo di controllo.

DISCUSSIONE

La terapia genica del glioblastoma rappresenta una strategia attualmente molto studiata. Le motivazioni di tale interesse trovano giustificazione nella recente descrizione di un numero crescente di geni la cui disfunzione sarebbe implicata nella patogenesi della malattia (Ohgaki and Kleihues 2007). Il grande numero delle vie di segnale intracellulare coinvolte nell'insorgenza del GBM, unitamente alle interconnessioni tra esse esistenti sono responsabili della refrattarietà di questa neoplasia alle singole terapie (Parsons, Jones et al. 2008; Brennan, Momota et al. 2009; Kanu, Hughes et al. 2009; Verhaak, Hoadley et al. 2010). Anche nello scenario terapeutico attuale, seppure ben lontano dal poter essere considerato soddisfacente, i migliori risultati sono conseguiti dalla combinazione di modalità terapeutiche differenti (Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010). Realisticamente, la terapia genica, ove fossero confermati gli attuali risultati preliminari, si configura come adiuvante ai presidi attualmente disponibili (Germano and Binello 2009). Se è inverosimile che possa essere individuata come singola modalità terapeutica capace di curare la patologia in questione, cionondimeno la possibilità di arricchire l'armamentario neuro-oncologico giustifica pienamente l'entusiasmo che essa ha suscitato (Chiocca 2003; Sarkar, Lebedeva et al. 2007; Germano, Uzzaman et al. 2008; Germano and Binello 2009).

Il problema del vettore da utilizzare nella traslazione clinica della terapia genica è stato ampiamente discusso dalla letteratura (McNeish, Bell et al. 2004; Lawler, Peruzzi et al. 2006; Germano and Binello 2009; Brignier and Gewirtz 2010). Come già descritto in precedenza, i vettori virali pongono dei problemi su diversi ambiti. L'impossibilità di integrare il transgene in oggetto in corrispondenza di un punto preciso del genoma ospite apre la possibilità all'insorgenza di fenomeni di mutagenesi inserzionale e di variabilità dell'espressione genica. Inoltre, permangono dubbi sulla maneggevolezza e la tossicità di un vettore che, per

quanto generalmente ben tollerato, per sua natura evoca una risposta immunitaria dell'ospite (Chiocca 2003; Cunningham, Chada et al. 2005; Hakkarainen, Hemminki et al. 2006; Jiang, McCormick et al. 2006).

D'altra parte, le metodiche di tipo chimico-fisico sono ancora troppo inefficienti per poter essere proposte come valide alternative. I recenti avanzamenti nel campo delle nanotecnologie fanno tuttavia supporre che l'allestimento di vettori artificiali potrà rivestire un ruolo di primo piano in futuro (Kingsley, Dou et al. 2006).

Da questo punto di vista, l'impiego delle cellule staminali pare offrire le maggiori garanzie di successo a breve termine (Brignier and Gewirtz 2010). Gli approcci proposti sono sostanzialmente di due tipi diversi. Da un lato l'utilizzo delle cellule staminali multipotenti consentirebbe il prelievo, dallo stesso paziente, di un pool cellulare da ingegnerizzare e reimpiantare in un secondo momento (Yu, Vodyanik et al. 2007; Menon, Kelly et al. 2009; Mitsui, Suzuki et al. 2009; Zou, Maeder et al. 2009; Balyasnikova, Ferguson et al. 2010). D'altra parte il ricorso alle cellule staminali embrionali pluripotenti consentirebbe, mediante metodiche di ricombinazione omologa, l'allestimento di linee cellulari che, una volta messe a punto, potrebbero essere prontamente disponibili in commercio indipendentemente dalle capacità tecnologiche degli operatori coinvolti (Zwaka and Thomson 2003; Uzzaman, Benveniste et al. 2005; Germano, Uzzaman et al. 2008; Tenzen, Zembowicz et al. 2009; Zou, Maeder et al. 2009; Germano, Emdad et al. 2010).

Nella nostra esperienza abbiamo utilizzato una linea di cellule staminali embrionali di topo ingegnerizzate, mediante ricombinazione omologa, ad esprimere il transgene *MDA-7/IL-24* in risposta alla somministrazione di doxyciclina. Questo approccio, già descritto in letteratura sia per altri geni che per quello oggetto della nostra esperienza, offre indubitabili vantaggi (Benveniste, Keller et al. 2005; Germano, Uzzaman et al. 2006; Germano, Emdad et al. 2010).

L'inserzione precisa e permanente del transgene nel DNA ospite mediante metodica di ricombinazione omologa offre la possibilità di disporre di quantità virtualmente illimitate di vettori cellulari transgenici, con caratteristiche di espressione genica omogenea. Inoltre, l'utilizzo di un promotore genico del tipo inducibile dalle tetracicline consente di regolare in modo affidabile l'espressione del transgene di interesse, qualora la sua produzione non fosse più desiderabile in fasi successive del trattamento. Infine, il ricorso alle cellule staminali embrionali pluripotenti consente di ottenere, attraverso protocolli standard di differenziazione, qualsiasi tipo di cellula fosse necessaria. Nel nostro caso era particolarmente desiderabile la possibilità di ottenere astrociti differenziati che potessero essere in grado di esprimere il transgene *MDA-7/IL-24*.

La differenziazione degli astrociti è stata documentata dal punto di vista morfologico con immagini di microscopia ottica, a contrasto di fase e metodiche di immunofluorescenza. Le metodiche in vitro descritte nel presente lavoro sono il frutto di un costante adattamento alla necessità di ottenere una popolazione omogenea di astrociti maturi e derivano da esperienze precedenti (Uzzaman, Benveniste et al. 2005; Germano, Emdad et al. 2010). Il processo differenziativo, a partire dai corpi embrionali, è avvenuto in assenza di elementi cellulari condizionanti e sono stati utilizzati terreni di coltura ben precisi, eliminando l'aleatorietà legata all'utilizzo di terreni condizionati dalla presenza di cellule estranee. Facendo riferimento ai dati dello stesso gruppo di ricerca, presenti in letteratura, si evince che la differenziazione genera una popolazione quasi esclusivamente costituita da astrociti maturi. I dati ottenuti mostrano la differenziazione di una popolazione eterogenea di astrociti e sono in accordo con quanto precedentemente descritto da altri autori (Raff, Abney et al. 1983; Fedoroff, Neal et al. 1984). A partire da elementi cellulari indifferenziati, dal soma rotondeggiante, che tendono a crescere in colonie in cui le membrane cellulari risultano per la maggior parte adiacenti le une alle altre, si giunge a condizioni di maturazione in cui gli astrociti sono ben evidenziabili. I corpi

cellulari divengono facilmente discriminabili gli uni dagli altri e le cellule rimangono in contatto, specialmente attraverso propaggini del loro citoplasma che gli conferiscono la caratteristica morfologia stellata. Le cellule di forma stellata sono state catalogate da diversi autori come astrociti di tipo 1, mentre quelle dalla morfologia più compatta come astrociti di tipo 2. La discriminazione morfologica delle due popolazioni astrocitarie trova un corrispettivo funzionale nella loro composizione biochimica. Gli astrociti di tipo 2, infatti, presentano una quantità assai superiore di glicolipidi di membrana (Murakami, Asou et al. 1999). Questa caratteristica conferirebbe loro delle specifiche proprietà funzionali non ancora completamente chiarite. In ogni caso, la differenziazione di una popolazione astrocitaria mista, dimostrata nel corso dei nostri esperimenti, potrebbe rappresentare un vantaggio, poichè offre la possibilità di avere a disposizione elementi cellulari con funzioni fisiologiche verosimilmente diverse che sono in grado di esprimere il transgene *MDA-7/IL-24*. L'espressione del marcatore astrocitario GFAP, confermata nelle nostre colonie cellulari sia con metodiche morfologiche ad immunofluorescenza che mediante citofluorimetria di flusso, è considerata tipica degli astrociti maturi e fornisce un'ulteriore indicazione della corretta differenziazione (Raff, Abney et al. 1983; Fedoroff, Neal et al. 1984; Uzzaman, Benveniste et al. 2005). Nonostante l'osservazione di una certa asincronia del processo differenziativo tra colonie cellulari coltivate nelle medesime condizioni, nella nostra esperienza non abbiamo potuto osservare la presenza di elementi indifferenziati nell'ambito di popolazioni astrocitarie mature. Tuttavia, i dati disponibili in letteratura suggeriscono la permanenza una piccola percentuale di cellule staminali non differenziate (Benveniste, Keller et al. 2005; Uzzaman, Benveniste et al. 2005; Germano, Uzzaman et al. 2006). Sebbene queste non abbiano mai dato luogo a teratomi in condizioni sperimentali in vivo, tuttavia tendono a contaminare le colture mantenute a lungo termine e, pertanto, pongono il problema di una proliferazione incontrollata sul piano teorico. Questo aspetto è di notevole rilevanza poichè l'assenza di proliferazione

rappresenta uno dei punti di forza dell'utilizzo di cellule completamente differenziate rispetto a cellule staminali tout-court. In questo senso è auspicabile un ulteriore miglioramento delle procedure di coltura e differenziazione, che possano consentire di isolare una popolazione di astrociti maturi non contaminata da elementi staminali residui.

Gli astrociti transgenici ottenuti si sono dimostrati in grado di esprimere *MDA-7/IL-24* in risposta alla somministrazione di doxiciclina. Questa proprietà è stata documentata attraverso lo studio morfologico con microscopia a fluorescenza nonché mediante metodiche di citofluorimetria di flusso e western blot. I dati ottenuti sono tra essi concordi nel dimostrare una buona induzione dell'espressione genica da parte della doxiciclina, sebbene fosse osservabile una espressione costitutiva del transgene *MDA-7/IL-24*. Questo fenomeno, detto di "leakage", è già stato osservato in precedenza in altri contesti (Pfeiffer, Ngo et al. 2010). Il fatto che l'espressione costitutiva del transgene fosse assente in precedenti esperienze del gruppo di ricerca del Mount Sinai con *TRAIL* fa supporre che possa trattarsi di un fenomeno legato all'utilizzo del transgene *MDA-7/IL-24* (Germano, Uzzaman et al. 2006). È possibile che il costrutto genico utilizzato nel processo di ricombinazione omologa delle cellule staminali non sia in grado di creare le stesse condizioni genetiche osservate per *TRAIL* e che, pertanto, la minima espressione costitutiva della proteina *MDA-7/IL-24* sia un dato che dipenda dall'attivazione aspecifica del promotore, come già riportato in letteratura (Pfeiffer, Ngo et al. 2010). Va tuttavia ricordato che gli effetti di *MDA-7/IL-24* dipendono dalla concentrazione di questa proteina, fatto che ridimensiona l'importanza funzionale della minima espressione costitutiva osservata (Yacoub, Gupta et al. 2008). In ogni caso, un approfondimento delle ricerche in merito è auspicabile al fine di poter disporre con certezza di un transgene la cui espressione sia strettamente legata alla somministrazione di tetracicline.

Un aspetto rilevante, nell'ambito della caratterizzazione degli astrociti transgenici ottenuti, ha riguardato l'analisi della loro capacità migratoria. Le tecniche in vitro utilizzate hanno potuto confermare questa peculiarità. I dati ottenuti sono in linea con quanto descritto in letteratura, ove sono presenti anche esperienze in vivo (Andersson, Tytell et al. 1993; Chu, Hughes et al. 2001; Jacobsen and Miller 2003; Benveniste, Keller et al. 2005; Uzzaman, Benveniste et al. 2005). La capacità migratoria degli astrociti nell'ambito del tessuto nervoso è una caratteristica ben nota che li rende dei veicoli molto vantaggiosi nella terapia genica dei gliomi. È stato altresì dimostrato uno spiccato tropismo di queste cellule per lesioni di varia natura del sistema nervoso (Benveniste, Keller et al. 2005; Uzzaman, Benveniste et al. 2005). La capacità di colocalizzarsi con cellule di GBM, anche con quelle costituenti zone di infiltrazione microscopica, fa supporre la possibilità di eradicare i foci di microinfiltrazione neoplastica, che hanno sinora pregiudicato la cura della malattia a causa dell'insorgenza delle recidive dopo terapia.

L'analisi dell'apoptosi delle cellule di glioma umano ad alto grado U87 indotta da MDA-7/IL-24 ha fornito risultati di complessa interpretazione. Anzitutto, gli unici effetti apoptotici chiari sono emersi a seguito della co-coltura delle cellule di GBM con gli astrociti transgenici *MDA-7/IL-24*, in presenza di doxiciclina. La quantificazione dell'Annexina V non ha consentito di rilevare una differenza statisticamente significativa rispetto al controllo mentre l'impiego del colorante vitale Trypan blue ha fornito risultati significativi. Al di là delle peculiarità proprie delle due metodiche, va osservato che l'esiguità campionaria ha sicuramente svolto un ruolo nella determinazione di tale risultato. I dati provengono da esperimenti eseguiti in triplicato ed è verosimile che un'espansione del campione possa confermare la tendenza dimostrata. Considerando comunque valido il dato relativo all'induzione dell'apoptosi nelle cellule U87, è interessante notare come in mancanza della somministrazione di doxiciclina non si osservi induzione della morte cellulare. Questo dato

confermerebbe l'ipotesi precedentemente discussa, secondo cui l'espressione costitutiva di *MDA-7/IL-24* a bassi livelli non sarebbe sufficiente ad evocare un effetto antineoplastico apprezzabile. Inoltre, il fatto che le cellule U87 non presentino difetti di *p53*, conferma il dato presente in letteratura circa l'utilità di *MDA-7/IL-24* indipendentemente dall'ipoespressione di tale gene oncosoppressore (Su, Lebedeva et al. 2003). Più controverso è il dato riguardo all'assoluta inefficacia della proteina purificata *MDA-7/IL-24*. Infatti, i vettori cellulari non hanno la funzione di consentire l'espressione genica a livello delle cellule neoplastiche, prerogativa dei vettori virali (Germano and Binello 2009). Pertanto, l'effetto proapoptotico degli astrociti transgenici *MDA-7/IL-24* si baserebbe sulle proprietà terapeutiche della proteina *MDA-7/IL-24* da essi prodotta e secreta (Germano, Emdad et al. 2010). Essa sarebbe responsabile dell'induzione dell'apoptosi attraverso la stimolazione di specifici recettori di membrana esistenti sulle cellule U87 (Fig. 31).

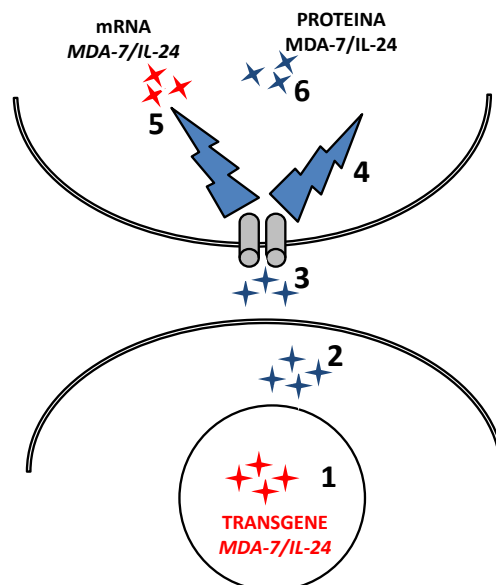


Fig. 31: Lo schema mostra gli eventi molecolari alla base dell'azione terapeutica degli astrociti transgenici *MDA-7/IL-24*. L'espressione del transgene (1) esita nella produzione della proteina *MDA-7/IL-24* (2) che viene secreta dall'astrocita e stimola i recettori di membrana delle cellule bersaglio (3). L'attivazione dei recettori di membrana genera degli effetti diretti su varie cascate di segnale (4) e la stabilizzazione del mRNA di *MDA-7/IL-24* espresso costitutivamente (5). L'accumulo della proteina a livello citoplasmatico provoca gli eventi cellulari alla base delle sue proprietà antineoplastiche (6).

Tale stimolazione provocherebbe il reclutamento di numerose vie di segnale cellulare ed al contempo indurrebbe, secondo meccanismi già illustrati, la stabilizzazione del mRNA e l'iperproduzione della proteina MDA-7/IL-24 endogeni (Su, Lebedeva et al. 2003; Su, Emdad et al. 2005; Sauane, Su et al. 2008; Emdad, Lebedeva et al. 2009). Rimane quindi da chiarire come mai esista una tale discrepanza di risultati a fronte di due proteine che dovrebbero essere identiche. È verosimile che la proteina purificata possa essere differente da quella prodotta dagli astrociti, non tanto dal punto di vista della sequenza aminoacidica, quanto piuttosto delle modificazioni maturative post-traduzionali a cui essa andrebbe incontro. Un diverso processo maturativo della proteina in questione potrebbe spiegare la mancanza di effetto apoptotico di quella purificata rispetto a quella prodotta in situ dagli astrociti ingegnerizzati. D'altra parte, le dosi di proteina utilizzate, sebbene superiori a quelle riportate in letteratura, sono difficilmente comparabili con la concentrazione conseguente alla secrezione da parte degli astrociti (Yacoub, Gupta et al. 2008). In mancanza di studi specifici che abbiano valutato l'effettiva esistenza di recettori di membrana per MDA-7/IL-24 nelle cellule U87, è stato precedentemente osservato un effetto dose-dipendente della proteina ricombinante su tali cellule, a suggerirne la presenza (Su, Emdad et al. 2005; Yacoub, Gupta et al. 2008). È stato altresì proposto che parte degli effetti terapeutici di MDA-7/IL-24 ad alte concentrazioni possano derivare dall'interazione con recettori di membrana aspecifici (Yacoub, Gupta et al. 2008). È altresì possibile che l'effetto osservato possa dipendere da un meccanismo sconosciuto, legato alla presenza degli astrociti. A tal proposito va comunque ricordato che gruppi di ricerca indipendenti hanno addirittura messo in dubbio l'effetto terapeutico della proteina MDA-7/IL-24 in un grande numero di linee cellulari. Questo fenomeno sarebbe giustificato dall'assenza di recettori specifici per MDA-7/IL-24 nella maggior parte delle cellule testate, sebbene tra esse non fosse compresa la linea U87 (Kreis, Philippidou et al. 2007). Da questo punto di vista, la nostra esperienza

pone degli interrogativi che non trovano risposta nei dati riportati in letteratura e che, pertanto, dovrebbero essere oggetto di ulteriori indagini al fine di chiarire l'effettiva presenza di recettori di membrana specifici sulle cellule U87 e le dinamiche recettoriali alla base della differente affinità riscontrata per la proteina ricombinante piuttosto che per quella secreta dagli astrociti.

Se i risultati riportati in vitro hanno riguardato aspetti già descritti in precedenza, non esistono invece dati relativi all'utilizzo di astrociti transgenici *MDA-7/IL-24* in modelli animali di GBM intracranico. Sebbene i modelli canini siano quelli che più si avvicinano alle condizioni esistenti nel GBM umano, essi rappresentano un'alternativa molto impegnativa dal punto di vista logistico. Nella nostra esperienza abbiamo utilizzato un modello murino di glioma intracerebrale basato sullo xenotrapianto ortotopico di cellule di glioma ad alto grado umano U87. Trattandosi di cellule umane è stato necessario impiegare topi nudi atimici, onde evitare l'insorgenza di reazioni immunitarie verso le cellule U87. D'altra parte, questo aspetto ha consentito di testare le proprietà antineoplastiche degli astrociti transgenici *MDA-7/IL-24* in condizioni indipendenti dalla modulazione del sistema immunitario. Nel panorama dei modelli preclinici in vivo di GBM l'innesto di cellule U87 offre un buon compromesso. Infatti, le cellule presentano un certo grado di atipia ed una crescita vivace, sono inoltre presenti fenomeni di neoangiogenesi tipici del GBM umano nonché di emorragia intratumorale. Mancano tuttavia le zone di necrosi e la massiva infiltrazione dei tessuti circostanti la lesione. Il riscontro morfologico nei nostri preparati, esaminati a seguito dell'allestimento di sezioni colorate con ematossilina ed eosina, ha confermato i reperti già descritti in letteratura (Candolfi, Curtin et al. 2007). Dal punto di vista quantitativo la misurazione delle lesioni è stata effettuata mediante valutazione delle aree neoplastiche presenti nelle sezioni istologiche. I volumi ottenuti sono naturalmente delle stime che, tuttavia, trovano una validità anche nell'impiego clinico umano. Inoltre, la stima del volume rappresenta una misura molto più affidabile rispetto alla semplice misurazione del diametro

lesionale. Nella nostra esperienza, la variabilità operatore-dipendente delle misurazioni è risultata pari a circa 1% dei volumi stimati (dati non presentati). Riteniamo che questo risultato confermi la validità del metodo adottato. La letteratura in merito è piuttosto eterogenea e non vi è accordo sui metodi che andrebbero utilizzati per valutare le risposte alla terapia. Pertanto, accanto a metodi scarsamente affidabili, quali la sopraggiunta morte dell'animale, si trovano valutazioni del peso della lesione, del volume calcolato sulla base dei diametri maggiori, ma anche del volume ottenuto sia mediante valutazione istologica delle sezioni della neoplasia che attraverso più moderne metodiche di imaging con RMN (Kim, Wang et al. 2006; Candolfi, Curtin et al. 2007; Yang, Chopp et al. 2007; Menon, Kelly et al. 2009). Sorprendentemente, la stessa eterogeneità si manifesta per quanto riguarda il numero di cellule U87 da impiantare, nonché per i volumi ottenuti (Tab. 4) (Guerin, Luddy et al. 2000; MacDonald, Taga et al. 2001; Phuong, Allen et al. 2003; Zhang, Frolov et al. 2004; Grzelinski, Urban-Klein et al. 2006; Kim, Wang et al. 2006; Kim, Hong et al. 2007; Rustamzadeh, Hall et al. 2007; Wei, Wahl et al. 2007; Yang, Chopp et al. 2007; Zarnescu, Brehar et al. 2008; Chen, Ping et al. 2009; Hoffmann, Fichtner et al. 2009; Madhankumar, Slagle-Webb et al. 2009; Menon, Kelly et al. 2009). Tendenzialmente le lesioni divengono di dimensioni cospicue dopo circa 3 settimane e crescono ancora più rapidamente dopo tale periodo, portando l'animale a morte in poco più di un mese (Candolfi, Curtin et al. 2007). Nella nostra esperienza abbiamo scelto di proseguire le attività sperimentali per 3 settimane dopo l'impianto delle cellule U87. Non abbiamo mai osservato la morte prematura degli animali per cause connesse alla crescita della lesione intracranica. Le cellule sono state inoculate alla dose di 5×10^5 cellule/5 μ l, in accordo con la media delle dosi utilizzate in letteratura. Un dato interessante che emerge dall'analisi delle medesime esperienze è quello relativo alla proporzione inversa che parrebbe esserci tra volume neoplastico e volume della sospensione di cellule U87 impiantate (Tab. 4). È possibile che una maggiore concentrazione

della sospensione cellulare favorisca l'attecchimento dello xenotrapianto, essendo l'ambiente cerebrale ostile per qualsiasi processo occupante spazio. D'altra parte, una eccessiva concentrazione della sospensione cellulare pone problemi tecnici al momento dell'iniezione intracerebrale per la facile ostruzione dell'ago utilizzato.

L'analisi morfometrica delle lesioni ottenute ha messo in evidenza una notevole variabilità tra animali dello stesso braccio sperimentale. Le deviazioni standard sono risultate esageratamente elevate in tutti i gruppi, ma specialmente in quelli in cui sono stati inoculati, unitamente alle cellule U87, gli astrociti transgenici. Un'analisi più approfondita dei risultati mette in evidenza una riduzione volumetrica significativa nei gruppi trattati con astrociti rispetto al controllo. Il problema sorge poichè non pare esservi stata alcuna influenza della somministrazione di doxiciclina sulle riduzioni volumetriche. Tuttavia, posto che il gruppo di controllo mostra volumi nettamente superiori agli altri, bisogna considerare che, nei due gruppi in cui sono stati inoculati gli astrociti transgenici, la numerosità campionaria è stata ridotta dal decesso prematuro di diversi animali per cause non legate alle procedure sperimentali. Questo discorso vale specialmente per il gruppo non trattato con doxiciclina, che risulta composto da soli 6 animali a fronte degli 8 che popolavano gli altri due gruppi. Questo evento potrebbe aver condizionato l'analisi dei dati effettuata. In aggiunta, nel gruppo sottoposto a trattamento con doxiciclina, è stato riscontrato un volume assolutamente inusuale anche in condizioni sperimentali di controllo. Il topo 253, infatti, ha sviluppato una neoplasia di circa 142 mm^3 , pari al valore massimo osservato nel gruppo non sottoposto ad alcun trattamento. A tal proposito l'esame delle mediane, piuttosto che delle medie, mette in luce una netta differenza tra i gruppi sperimentali. I valori mediani sono infatti pari a circa 88 mm^3 nel gruppo di controllo, a circa 24 mm^3 nel gruppo non trattato con doxiciclina ed infine a circa 4 mm^3 nel gruppo trattato con tetracicline. Pertanto, la mancanza di significatività dei dati riscontrati non deve trarre in inganno, in

quanto è stata comunque osservata una tendenza verso la riduzione volumetrica delle neoplasie nei gruppi trattati con astrociti. Questa tendenza emerge chiaramente se si considerano i grafici a dispersione che mostrano, nonostante la presenza di valori estremi, una tendenza alla segregazione dei diversi gruppi sperimentali (Fig. 32).

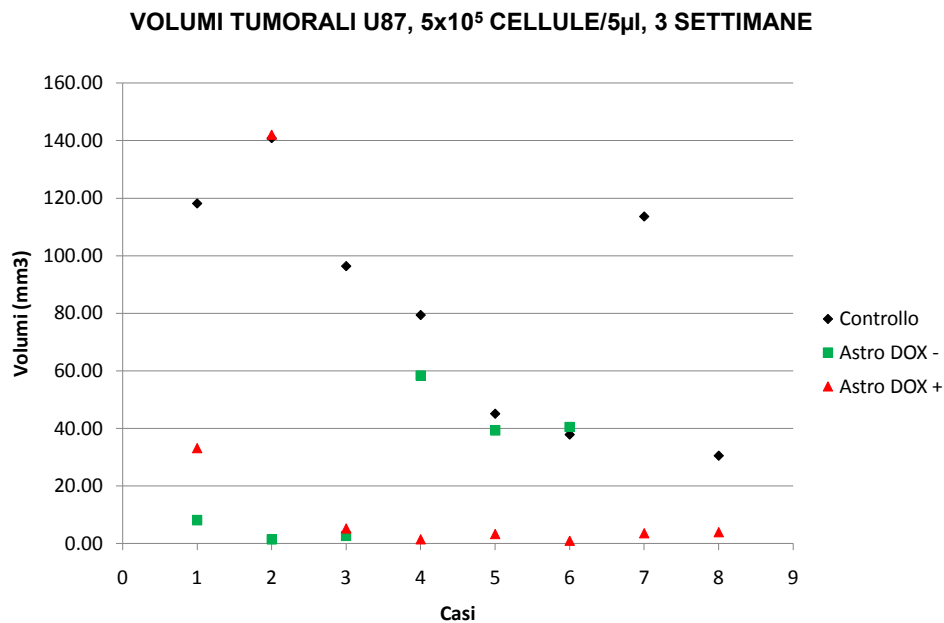


Fig. 32: Il grafico a dispersione indica i volumi neoplastici misurati nei tre gruppi sperimentali in vivo. Nonostante la sovrapposizione esistente tra i diversi gruppi si osserva una tendenza alla segregazione con valori volumetrici massimi nel gruppo non trattato con astrociti (indicatori neri), valori intermedi nel gruppo trattato con astrociti ma non con doxiciclina (indicatori verdi) e minimi nel gruppo trattato con astrociti e doxiciclina (indicatori rossi).

La variabilità dei volumi ottenuti a seguito dell'impianto intracerebrale di cellule U87 nei topi è un dato riscontrabile nella letteratura (Tab. 4).

Pertanto, è difficile prevedere se un'estensione delle attività sperimentali possa risultare in una maggior coerenza dei dati a disposizione o se piuttosto l'ampia deviazione standard sia un dato destinato a permanere per la scarsa riproducibilità delle lesioni. L'implementazione delle attività sperimentali in vivo, sia sul medesimo modello basato su cellule U87 che su altri modelli sperimentali,

potrebbe fornire ulteriori indicazioni in merito. Sarebbe inoltre opportuno procedere alla caratterizzazione dei fenomeni apoptotici in situ, mediante tecnica TUNEL, nonché della documentazione dell'espressione di MDA-7/IL-24 con metodiche di immunohistochimica.

RIFERIMENTO	N CELLULE	VOLUME TUMORE (mm ³)	DURATA ESPERIMENTO
(Menon, Kelly et al. 2009)	3x10 ⁴ /3 µl	29.48±25.27	19 giorni
(Madhankumar, Slagle-Webb et al. 2009)	1x10 ⁶ /10 µl	11	2-3 settimane
(Hoffmann, Fichtner et al. 2009)	ND	ND	ND
(Chen, Ping et al. 2009)	3x10 ⁵ /10 µl	8	5 settimane
(Zarnescu, Brehar et al. 2008)	5x10 ⁵ /3 µl	14.75±12.09	4 settimane
(Yang, Chopp et al. 2007)	5x10 ⁵ /5 µl	50	4 settimane
(Wei, Wahl et al. 2007)	5x10 ⁵ /5 µl	50	4 settimane
(Rustamzadeh, Hall et al. 2007)	10 ⁵ /3 µl	Dimensioni apprezzabili/ Emisfero completo	10 giorni/3 settimane
(Kim, Hong et al. 2007)	2x10 ⁵ /3 µl	18.3±5.79 mm ²	25 giorni
(Kim, Wang et al. 2006)	10 ⁵ /5 µl	26.7±2.5	18 giorni
(Grzelinski, Urban-Klein et al. 2006)	7x10 ⁵	20±1	3 giorni
(Zhang, Frolov et al. 2004)	10 ⁶	20±13	31 giorni
(Phuong, Allen et al. 2003)	10 ⁶	9±3	3 settimane
(MacDonald, Taga et al. 2001)	10 ⁶ /10 µl	5.5±0.5	28 giorni
(Guerin, Luddy et al. 2000)	10 ⁵ /2 µl	59.4±25.1	3 settimane

Tab. 4: Le esperienze presenti in letteratura sull'utilizzo delle cellule U87 in modelli murini di xenotrapianto ortotopico sono estremamente eterogenee. Non essendo disponibile alcun articolo specifico sull'argomento i dati sono stati estrapolati dalla letteratura disponibile.

CONCLUSIONI

Lo studio genetico del glioblastoma multiforme (GBM) ha consentito di caratterizzare numerose lesioni geniche correlate con lo sviluppo di questa neoplasia. L'eterogeneità delle lesioni riscontrate rappresenta uno dei fattori alla base degli insuccessi terapeutici sinora riportati. Le terapie convenzionali, infatti, non tengono conto di una suddivisione dei pazienti in sottoclassi e colpiscono bersagli molecolari aspecifici. La terapia genica, per le possibilità di personalizzazione che offre, appare come una valida strategia nel trattamento del GBM. Due elementi fondamentali che condizionano l'efficacia della terapia genica sono la scelta del transgene terapeutico e del vettore per il transgene. Nel presente lavoro abbiamo descritto le metodiche alla base della terapia sperimentale del GBM, utilizzando astrociti derivati da cellule staminali embrionali murine ingegnerizzate con il transgene *MDA-7/IL-24*. I dati raccolti hanno consentito di confermare la differenziazione delle cellule staminali in astrociti e la buona espressione del transgene *MDA-7/IL-24* in risposta alla somministrazione di doxiciclina. Le procedure sperimentali, sia in vitro che in vivo, hanno confermato l'effetto proapoptotico degli astrociti transgenici sulle cellule di glioma umano ad alto grado U87, nonché la capacità migratoria degli astrociti verso le cellule neoplastiche. I dati sinora ottenuti, seppure preliminari, giustificano il proseguimento delle attività sperimentali al fine di consentire, qualora gli effetti antineoplastici fossero confermati, l'allestimento di studi clinici sull'uomo.

BIBLIOGRAFIA

- Aboody, K. S., A. Brown, et al. (2000). "Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12846-51.
- Ali, S., J. F. Curtin, et al. (2004). "Inflammatory and anti-glioma effects of an adenovirus expressing human soluble Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (hsFlt3L): treatment with hsFlt3L inhibits intracranial glioma progression." Mol Ther **10**(6): 1071-84.
- Anderson, D. J., F. H. Gage, et al. (2001). "Can stem cells cross lineage boundaries?" Nat Med **7**(4): 393-5.
- Andersson, C., M. Tytell, et al. (1993). "Transplantation of cultured type 1 astrocyte cell suspensions into young, adult and aged rat cortex: cell migration and survival." Int J Dev Neurosci **11**(5): 555-68.
- Androutsellis-Theotokis, A., R. R. Leker, et al. (2006). "Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo." Nature **442**(7104): 823-6.
- Asano, T., N. Ageyama, et al. (2003). "Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells." Transplantation **76**(7): 1061-7.
- Balyasnikova, I. V., S. D. Ferguson, et al. (2010). "Mesenchymal stem cells modified with a single-chain antibody against EGFRvIII successfully inhibit the growth of human xenograft malignant glioma." PLoS One **5**(3): e9750.
- Baron, M. (2003). "An overview of the Notch signalling pathway." Semin Cell Dev Biol **14**(2): 113-9.
- Benveniste, R. J., G. Keller, et al. (2005). "Embryonic stem cell-derived astrocytes expressing drug-inducible transgenes: differentiation and transplantation into the mouse brain." J Neurosurg **103**(1): 115-23.
- Blowers, L., S. Preston-Martin, et al. (1997). "Dietary and other lifestyle factors of women with brain gliomas in Los Angeles County (California, USA)." Cancer Causes Control **8**(1): 5-12.
- Brennan, C., H. Momota, et al. (2009). "Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations." PLoS One **4**(11): e7752.
- Brenner, A. V., M. S. Linet, et al. (2002). "History of allergies and autoimmune diseases and risk of brain tumors in adults." Int J Cancer **99**(2): 252-9.
- Brignier, A. C. and A. M. Gewirtz (2010). "Embryonic and adult stem cell therapy." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S336-44.
- Candolfi, M., J. F. Curtin, et al. (2007). "Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression." J Neurooncol **85**(2): 133-48.
- Caudell, E. G., J. B. Mumm, et al. (2002). "The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24." J Immunol **168**(12): 6041-6.
- Cavazzana-Calvo, M., S. Hacein-Bey, et al. (2000). "Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease." Science **288**(5466): 669-72.
- CBTRUS (2010). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2006, Central Brain Tumor Registry of the United States, Hinsdale, IL.

- Chada, S., A. M. Mhashilkar, et al. (2004). "Bystander activity of Ad-mda7: human MDA-7 protein kills melanoma cells via an IL-20 receptor-dependent but STAT3-independent mechanism." *Mol Ther* **10**(6): 1085-95.
- Chada, S., R. B. Sutton, et al. (2004). "MDA-7/IL-24 is a unique cytokine--tumor suppressor in the IL-10 family." *Int Immunopharmacol* **4**(5): 649-67.
- Chamberlain, M. C. (2006). "Treatment options for glioblastoma." *Neurosurg Focus* **20**(4): E19.
- Chang, F., L. S. Steelman, et al. (2003). "Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review)." *Int J Oncol* **22**(3): 469-80.
- Chen, D. L., Y. F. Ping, et al. (2009). "Downregulating FPR restrains xenograft tumors by impairing the angiogenic potential and invasive capability of malignant glioma cells." *Biochem Biophys Res Commun* **381**(3): 448-52.
- Chiocca, E. A. (2003). "Gene therapy: a primer for neurosurgeons." *Neurosurgery* **53**(2): 364-73; discussion 373.
- Chiocca, E. A., K. M. Abbed, et al. (2004). "A phase I open-label, dose-escalation, multi-institutional trial of injection with an E1B-Attenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting." *Mol Ther* **10**(5): 958-66.
- Chou, J. and B. Roizman (1992). "The gamma 1(34.5) gene of herpes simplex virus 1 precludes neuroblastoma cells from triggering total shutoff of protein synthesis characteristic of programmed cell death in neuronal cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(8): 3266-70.
- Chu, Y., S. Hughes, et al. (2001). "Differentiation and migration of astrocyte precursor cells and astrocytes in human fetal retina: relevance to optic nerve coloboma." *FASEB J* **15**(11): 2013-5.
- Cichowski, K. and T. Jacks (2001). "NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP." *Cell* **104**(4): 593-604.
- Cohen, M. H., Y. L. Shen, et al. (2009). "FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme." *Oncologist* **14**(11): 1131-8.
- Cordier, S., B. Lefevre, et al. (1997). "Parental occupation, occupational exposure to solvents and polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of childhood brain tumors (Italy, France, Spain)." *Cancer Causes Control* **8**(5): 688-97.
- Cunningham, C. C., S. Chada, et al. (2005). "Clinical and local biological effects of an intratumoral injection of mda-7 (IL24; INGN 241) in patients with advanced carcinoma: a phase I study." *Mol Ther* **11**(1): 149-59.
- Dasari, V. R., K. Kaur, et al. (2010). "Upregulation of PTEN in glioma cells by cord blood mesenchymal stem cells inhibits migration via downregulation of the PI3K/Akt pathway." *PLoS One* **5**(4): e10350.
- de Bruin, E. C. and J. P. Medema (2008). "Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response." *Cancer Treat Rev* **34**(8): 737-49.
- De Roos, A. J., P. A. Stewart, et al. (2003). "Occupation and the risk of adult glioma in the United States." *Cancer Causes Control* **14**(2): 139-50.
- Donovan, P. J. and J. Gearhart (2001). "The end of the beginning for pluripotent stem cells." *Nature* **414**(6859): 92-7.

- Dumoutier, L., C. Leemans, et al. (2001). "Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types." J Immunol **167**(7): 3545-9.
- Eager, R., L. Harle, et al. (2008). "Ad-MDA-7; INGN 241: a review of preclinical and clinical experience." Expert Opin Biol Ther **8**(10): 1633-43.
- Ehebauer, M., P. Hayward, et al. (2006). "Notch signaling pathway." Sci STKE **2006**(364): cm7.
- Ehtesham, M., K. L. Black, et al. (2004). "Recent progress in immunotherapy for malignant glioma: treatment strategies and results from clinical trials." Cancer Control **11**(3): 192-207.
- Ehtesham, M., P. Kabos, et al. (2002). "Induction of glioblastoma apoptosis using neural stem cell-mediated delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." Cancer Res **62**(24): 7170-4.
- Elexpuru-Camiruaga, J., N. Buxton, et al. (1995). "Susceptibility to astrocytoma and meningioma: influence of allelism at glutathione S-transferase (GSTT1 and GSTM1) and cytochrome P-450 (CYP2D6) loci." Cancer Res **55**(19): 4237-9.
- Ellerhorst, J. A., V. G. Prieto, et al. (2002). "Loss of MDA-7 expression with progression of melanoma." J Clin Oncol **20**(4): 1069-74.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol **35**(4): 495-516.
- Emdad, L., I. V. Lebedeva, et al. (2009). "Historical perspective and recent insights into our understanding of the molecular and biochemical basis of the antitumor properties of mda-7/IL-24." Cancer Biol Ther **8**(5): 391-400.
- Erdo, F., C. Buhrlé, et al. (2003). "Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke." J Cereb Blood Flow Metab **23**(7): 780-5.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, et al. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." Nat Med **4**(11): 1313-7.
- Farassati, F., A. D. Yang, et al. (2001). "Oncogenes in Ras signalling pathway dictate host-cell permissiveness to herpes simplex virus 1." Nat Cell Biol **3**(8): 745-50.
- Fedoroff, S., J. Neal, et al. (1984). "Astrocyte cell lineage. III. The morphology of differentiating mouse astrocytes in colony culture." J Neurocytol **13**(1): 1-20.
- Fisher, P. B., R. V. Gopalkrishnan, et al. (2003). "mda-7/IL-24, a novel cancer selective apoptosis inducing cytokine gene: from the laboratory into the clinic." Cancer Biol Ther **2**(4 Suppl 1): S23-37.
- Floeth, F. W., N. Shand, et al. (2001). "Local inflammation and devascularization--in vivo mechanisms of the "bystander effect" in VPC-mediated HSV-Tk/GCV gene therapy for human malignant glioma." Cancer Gene Ther **8**(11): 843-51.
- Forsyth, P., G. Roldan, et al. (2008). "A phase I trial of intratumoral administration of reovirus in patients with histologically confirmed recurrent malignant gliomas." Mol Ther **16**(3): 627-32.
- Freeman, S. M., C. N. Abboud, et al. (1993). "The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified." Cancer Res **53**(21): 5274-83.
- Friedman, H. S., R. E. McLendon, et al. (1998). "DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma." J Clin Oncol **16**(12): 3851-7.

- Fritz, A., C. Percy, et al. (2000). ICD-O International classification of diseases for oncology. Geneva, World Health Organization.
- Fueyo, J., R. Alemany, et al. (2003). "Preclinical characterization of the antiglioma activity of a tropism-enhanced adenovirus targeted to the retinoblastoma pathway." *J Natl Cancer Inst* **95**(9): 652-60.
- Fueyo, J., C. Gomez-Manzano, et al. (2000). "A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo." *Oncogene* **19**(1): 2-12.
- Gaiano, N., J. S. Nye, et al. (2000). "Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain." *Neuron* **26**(2): 395-404.
- Germano, I. M. and E. Binello (2009). "Gene therapy as an adjuvant treatment for malignant gliomas: from bench to bedside." *J Neurooncol* **93**(1): 79-87.
- Germano, I. M., L. Emdad, et al. (2010). "Embryonic stem cell (ESC)-mediated transgene delivery induces growth suppression, apoptosis and radiosensitization, and overcomes temozolomide resistance in malignant gliomas." *Cancer Gene Ther* **17**(9): 664-74.
- Germano, I. M., J. Fable, et al. (2003). "Adenovirus/herpes simplex-thymidine kinase/ganciclovir complex: preliminary results of a phase I trial in patients with recurrent malignant gliomas." *J Neurooncol* **65**(3): 279-89.
- Germano, I. M., M. Uzzaman, et al. (2006). "Apoptosis in human glioblastoma cells produced using embryonic stem cell-derived astrocytes expressing tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." *J Neurosurg* **105**(1): 88-95.
- Germano, I. M., M. Uzzaman, et al. (2008). "Gene delivery by embryonic stem cells for malignant glioma therapy: hype or hope?" *Cancer Biol Ther* **7**(9): 1341-7.
- Giaume, C., A. Koulakoff, et al. (2010). "Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions." *Nat Rev Neurosci* **11**(2): 87-99.
- Goldstein, D. J. and S. K. Weller (1988). "Factor(s) present in herpes simplex virus type 1-infected cells can compensate for the loss of the large subunit of the viral ribonucleotide reductase: characterization of an ICP6 deletion mutant." *Virology* **166**(1): 41-51.
- Goldstein, D. J. and S. K. Weller (1988). "Herpes simplex virus type 1-induced ribonucleotide reductase activity is dispensable for virus growth and DNA synthesis: isolation and characterization of an ICP6 lacZ insertion mutant." *J Virol* **62**(1): 196-205.
- Gomez-Manzano, C., P. Mitlianga, et al. (2001). "Transfer of E2F-1 to human glioma cells results in transcriptional up-regulation of Bcl-2." *Cancer Res* **61**(18): 6693-7.
- Gopalan, B., A. Litvak, et al. (2005). "Activation of the Fas-FasL signaling pathway by MDA-7/IL-24 kills human ovarian cancer cells." *Cancer Res* **65**(8): 3017-24.
- Gopalkrishnan, R. V., M. Sauane, et al. (2004). "Cytokine and tumor cell apoptosis inducing activity of mda-7/IL-24." *Int Immunopharmacol* **4**(5): 635-47.
- Grzelinski, M., B. Urban-Klein, et al. (2006). "RNA interference-mediated gene silencing of pleiotrophin through polyethylenimine-complexed small interfering RNAs in vivo exerts antitumoral effects in glioblastoma xenografts." *Hum Gene Ther* **17**(7): 751-66.
- Gu, C., S. Li, et al. (2010). "Therapeutic effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in rat experimental leptomeningeal glioma model." *Cancer Lett* **291**(2): 256-62.

- Guerin, C., C. Luddy, et al. (2000). "Glioma inhibition by HGF/NK2, an antagonist of scatter factor/hepatocyte growth factor." Biochem Biophys Res Commun **273**(1): 287-93.
- Guha, A., M. M. Feldkamp, et al. (1997). "Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation." Oncogene **15**(23): 2755-65.
- Gunnarsson, S., D. Bexell, et al. (2010). "Intratumoral IL-7 delivery by mesenchymal stromal cells potentiates IFN γ -transduced tumor cell immunotherapy of experimental glioma." J Neuroimmunol **218**(1-2): 140-4.
- Gupta, P., M. R. Walter, et al. (2006). "BiP/GRP78 is an intracellular target for MDA-7/IL-24 induction of cancer-specific apoptosis." Cancer Res **66**(16): 8182-91.
- Hakkarainen, T., A. Hemminki, et al. (2006). "A conditionally replicative adenovirus that codes for a TK-GFP fusion protein (Ad5Delta24TK-GFP) for evaluation of the potency of oncolytic virotherapy combined with molecular chemotherapy." Int J Mol Med **18**(4): 751-9.
- Hall, A., J. M. Harrington, et al. (1991). "Mortality study of British pathologists." Am J Ind Med **20**(1): 83-9.
- Hamed, H. A., A. Yacoub, et al. (2010). "OSU-03012 enhances Ad.mda-7-induced GBM cell killing via ER stress and autophagy and by decreasing expression of mitochondrial protective proteins." Cancer Biol Ther **9**(7).
- Hamed, H. A., A. Yacoub, et al. (2010). "Inhibition of Multiple Protective Signaling Pathways and Ad.5/3 Delivery Enhances mda-7/IL-24 Therapy of Malignant Glioma." Mol Ther.
- Hampl, J. A., S. M. Camp, et al. (2003). "Potentiated gene delivery to tumors using herpes simplex virus/Epstein-Barr virus/RV tribrid amplicon vectors." Hum Gene Ther **14**(7): 611-26.
- Harrisingh, M. C. and A. C. Lloyd (2004). "Ras/Raf/ERK signalling and NF1." Cell Cycle **3**(10): 1255-8.
- Harsh, G. R., T. S. Deisboeck, et al. (2000). "Thymidine kinase activation of ganciclovir in recurrent malignant gliomas: a gene-marking and neuropathological study." J Neurosurg **92**(5): 804-11.
- He, C. and D. J. Klionsky (2009). "Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy." Annu Rev Genet **43**: 67-93.
- He, J., G. Reifenberger, et al. (1994). "Analysis of glioma cell lines for amplification and overexpression of MDM2." Genes Chromosomes Cancer **11**(2): 91-6.
- Hegi, M. E., A. C. Diserens, et al. (2005). "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 997-1003.
- Heidenreich, R., M. Machein, et al. (2004). "Inhibition of solid tumor growth by gene transfer of VEGF receptor-1 mutants." Int J Cancer **111**(3): 348-57.
- Heise, C., A. Sampson-Johannes, et al. (1997). "ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents." Nat Med **3**(6): 639-45.
- Hermanson, M., K. Funai, et al. (1992). "Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops." Cancer Res **52**(11): 3213-9.
- Hochberg, F., P. Toniolo, et al. (1984). "Head trauma and seizures as risk factors of glioblastoma." Neurology **34**(11): 1511-4.

- Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature **411**(6835): 366-74.
- Hoffmann, J., I. Fichtner, et al. (2009). "Sagopilone crosses the blood-brain barrier in vivo to inhibit brain tumor growth and metastases." Neuro Oncol **11**(2): 158-66.
- Huang, E. Y., M. T. Madireddi, et al. (2001). "Genomic structure, chromosomal localization and expression profile of a novel melanoma differentiation associated (mda-7) gene with cancer specific growth suppressing and apoptosis inducing properties." Oncogene **20**(48): 7051-63.
- Huang, H., R. Reis, et al. (1999). "Identification in human brain tumors of DNA sequences specific for SV40 large T antigen." Brain Pathol **9**(1): 33-42.
- Huncharek, M., B. Kupelnick, et al. (2003). "Dietary cured meat and the risk of adult glioma: a meta-analysis of nine observational studies." J Environ Pathol Toxicol Oncol **22**(2): 129-37.
- IARC. (2010). "IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans." Retrieved 15/7/2010, 2010, from <http://monographs.iarc.fr/>.
- Imitola, J., K. Raddassi, et al. (2004). "Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(52): 18117-22.
- Inskip, P. D., R. E. Tarone, et al. (2001). "Cellular-telephone use and brain tumors." N Engl J Med **344**(2): 79-86.
- Jacobsen, C. T. and R. H. Miller (2003). "Control of astrocyte migration in the developing cerebral cortex." Dev Neurosci **25**(2-4): 207-16.
- Jaenisch, R. and R. Young (2008). "Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming." Cell **132**(4): 567-82.
- Jennings, M. T., C. E. Hart, et al. (1997). "Transforming growth factor beta as a potential tumor progression factor among hyperdiploid glioblastoma cultures: evidence for the role of platelet-derived growth factor." J Neurooncol **31**(3): 233-54.
- Jiang, H. and J. Fueyo (2010). "Eradication of brain tumor stem cells with an oncolytic adenovirus." Discov Med **10**(50): 24-8.
- Jiang, H., J. J. Lin, et al. (1995). "Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression." Oncogene **11**(12): 2477-86.
- Jiang, H., F. McCormick, et al. (2006). "Oncolytic adenoviruses as antiglioma agents." Expert Rev Anticancer Ther **6**(5): 697-708.
- Jiang, H., Z. Z. Su, et al. (1996). "The melanoma differentiation associated gene mda-7 suppresses cancer cell growth." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(17): 9160-5.
- Johnson, M. D., M. T. Jennings, et al. (1993). "Transforming growth factor-beta in neural embryogenesis and neoplasia." Hum Pathol **24**(5): 457-62.
- Kanu, O. O., B. Hughes, et al. (2009). "Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways." Clin Med Oncol **3**: 39-52.
- Kawabe, S., T. Nishikawa, et al. (2002). "Adenovirus-mediated mda-7 gene expression radiosensitizes non-small cell lung cancer cells via TP53-independent mechanisms." Mol Ther **6**(5): 637-44.
- Kim, C. K., S. H. Hong, et al. (2007). "The recombinant kringle domain of urokinase plasminogen activator inhibits in vivo malignant glioma growth." Cancer Sci **98**(2): 253-8.

- Kim, K. J., L. Wang, et al. (2006). "Systemic anti-hepatocyte growth factor monoclonal antibody therapy induces the regression of intracranial glioma xenografts." Clin Cancer Res **12**(4): 1292-8.
- Kingsley, J. D., H. Dou, et al. (2006). "Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system." J Neuroimmune Pharmacol **1**(3): 340-50.
- Kotenko, S. V. (2002). "The family of IL-10-related cytokines and their receptors: related, but to what extent?" Cytokine Growth Factor Rev **13**(3): 223-40.
- Krause, D. S., N. D. Theise, et al. (2001). "Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell." Cell **105**(3): 369-77.
- Kreis, S., D. Philippidou, et al. (2007). "Recombinant interleukin-24 lacks apoptosis-inducing properties in melanoma cells." PLoS One **2**(12): e1300.
- Labuhn, M., G. Jones, et al. (2001). "Quantitative real-time PCR does not show selective targeting of p14(ARF) but concomitant inactivation of both p16(INK4A) and p14(ARF) in 105 human primary gliomas." Oncogene **20**(9): 1103-9.
- Lammering, G., T. H. Hewit, et al. (2003). "Anti-erbB receptor strategy as a gene therapeutic intervention to improve radiotherapy in malignant human tumours." Int J Radiat Biol **79**(7): 561-8.
- Lang, F. F., J. M. Bruner, et al. (2003). "Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: biological and clinical results." J Clin Oncol **21**(13): 2508-18.
- Lawler, S. E., P. P. Peruzzi, et al. (2006). "Genetic strategies for brain tumor therapy." Cancer Gene Ther **13**(3): 225-33.
- Lebedeva, I. V., L. Emdad, et al. (2007). "mda-7/IL-24, novel anticancer cytokine: focus on bystander antitumor, radiosensitization and antiangiogenic properties and overview of the phase I clinical experience (Review)." Int J Oncol **31**(5): 985-1007.
- Lebedeva, I. V., D. Sarkar, et al. (2003). "Bcl-2 and Bcl-x(L) differentially protect human prostate cancer cells from induction of apoptosis by melanoma differentiation associated gene-7, mda-7/IL-24." Oncogene **22**(54): 8758-73.
- Lebedeva, I. V., Z. Z. Su, et al. (2002). "The cancer growth suppressing gene mda-7 induces apoptosis selectively in human melanoma cells." Oncogene **21**(5): 708-18.
- Lebedeva, I. V., Z. Z. Su, et al. (2003). "Restoring apoptosis as a strategy for cancer gene therapy: focus on p53 and mda-7." Semin Cancer Biol **13**(2): 169-78.
- Lee, H., J. J. Song, et al. (2001). "Efficient gene transfer of VSV-G pseudotyped retroviral vector to human brain tumor." Gene Ther **8**(4): 268-73.
- Lee, M., M. Wrensch, et al. (1997). "Dietary and tobacco risk factors for adult onset glioma in the San Francisco Bay Area (California, USA)." Cancer Causes Control **8**(1): 13-24.
- Legler, J. M., L. A. Ries, et al. (1999). "Cancer surveillance series [corrected]: brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality." J Natl Cancer Inst **91**(16): 1382-90.
- Li, Y. C., C. C. Tzeng, et al. (2006). "Genomic alterations in human malignant glioma cells associate with the cell resistance to the combination treatment with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and chemotherapy." Clin Cancer Res **12**(9): 2716-29.

- Libermann, T. A., H. R. Nusbaum, et al. (1985). "Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin." Nature **313**(5998): 144-7.
- Loeb, L. A. (1991). "Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis." Cancer Res **51**(12): 3075-9.
- Long, Z., P. Lu, et al. (1999). "Molecular evaluation of biopsy and autopsy specimens from patients receiving in vivo retroviral gene therapy." Hum Gene Ther **10**(5): 733-40.
- Loos, B. and A. M. Engelbrecht (2009). "Cell death: a dynamic response concept." Autophagy **5**(5): 590-603.
- Lopes, M. B. (2003). "Angiogenesis in brain tumors." Microsc Res Tech **60**(2): 225-30.
- Louis, D. N., H. Ohgaki, et al. (2007). WHO Classification of tumours of the central nervous system. Lyon, IARC.
- Lu, W., X. Zhou, et al. (2004). "Suppression of invasion in human U87 glioma cells by adenovirus-mediated co-transfer of TIMP-2 and PTEN gene." Cancer Lett **214**(2): 205-13.
- Lumniczky, K., S. Desaknai, et al. (2002). "Local tumor irradiation augments the antitumor effect of cytokine-producing autologous cancer cell vaccines in a murine glioma model." Cancer Gene Ther **9**(1): 44-52.
- Ma, H. I., S. Z. Lin, et al. (2002). "Intratumoral gene therapy of malignant brain tumor in a rat model with angiostatin delivered by adeno-associated viral (AAV) vector." Gene Ther **9**(1): 2-11.
- MacDonald, T. J., T. Taga, et al. (2001). "Preferential susceptibility of brain tumors to the antiangiogenic effects of an alpha(v) integrin antagonist." Neurosurgery **48**(1): 151-7.
- MacLean, A. R., M. ul-Fareed, et al. (1991). "Herpes simplex virus type 1 deletion variants 1714 and 1716 pinpoint neurovirulence-related sequences in Glasgow strain 17+ between immediate early gene 1 and the 'a' sequence." J Gen Virol **72** (Pt 3): 631-9.
- Madhankumar, A. B., B. Slagle-Webb, et al. (2009). "Efficacy of interleukin-13 receptor-targeted liposomal doxorubicin in the intracranial brain tumor model." Mol Cancer Ther **8**(3): 648-54.
- Madireddi, M. T., Z. Z. Su, et al. (2000). "Mda-7, a novel melanoma differentiation associated gene with promise for cancer gene therapy." Adv Exp Med Biol **465**: 239-61.
- Maheshwari, R. K., V. Srikantan, et al. (1991). "Differential effects of interferon gamma and alpha on in vitro model of angiogenesis." J Cell Physiol **146**(1): 164-9.
- Mahller, Y. Y., S. S. Vaikunth, et al. (2008). "Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 via oncolytic herpesvirus inhibits tumor growth and vascular progenitors." Cancer Res **68**(4): 1170-9.
- Malmer, B., H. Gronberg, et al. (1999). "Familial aggregation of astrocytoma in northern Sweden: an epidemiological cohort study." Int J Cancer **81**(3): 366-70.
- Markert, J. M., M. D. Medlock, et al. (2000). "Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial." Gene Ther **7**(10): 867-74.
- Martuza, R. L., A. Mallick, et al. (1991). "Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant." Science **252**(5007): 854-6.

- Matheu, A., A. Maraver, et al. (2008). "The Arf/p53 pathway in cancer and aging." Cancer Res **68**(15): 6031-4.
- Matsuura, I., N. G. Denissova, et al. (2004). "Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads." Nature **430**(6996): 226-31.
- McNeish, I. A., S. J. Bell, et al. (2004). "Gene therapy progress and prospects: cancer gene therapy using tumour suppressor genes." Gene Ther **11**(6): 497-503.
- Menon, L. G., K. Kelly, et al. (2009). "Human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells expressing S-TRAIL as a cellular delivery vehicle for human glioma therapy." Stem Cells **27**(9): 2320-30.
- Merzak, A., S. McCrea, et al. (1994). "Control of human glioma cell growth, migration and invasion in vitro by transforming growth factor beta 1." Br J Cancer **70**(2): 199-203.
- Mezey, E., K. J. Chandross, et al. (2000). "Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow." Science **290**(5497): 1779-82.
- Mhashilkar, A. M., R. D. Schrock, et al. (2001). "Melanoma differentiation associated gene-7 (mda-7): a novel anti-tumor gene for cancer gene therapy." Mol Med **7**(4): 271-82.
- Mhashilkar, A. M., A. L. Stewart, et al. (2003). "MDA-7 negatively regulates the beta-catenin and PI3K signaling pathways in breast and lung tumor cells." Mol Ther **8**(2): 207-19.
- Miller, R. W. (1971). "Deaths from childhood leukemia and solid tumors among twins and other sibs in the United States, 1960-67." J Natl Cancer Inst **46**(1): 203-9.
- Mineta, T., S. D. Rabkin, et al. (1995). "Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas." Nat Med **1**(9): 938-43.
- Mitlianga, P. G., C. Sioka, et al. (2006). "p53 enhances the Delta-24 conditionally replicative adenovirus anti-glioma effect." Oncol Rep **15**(1): 149-53.
- Mitsui, K., K. Suzuki, et al. (2009). "Gene targeting in human pluripotent stem cells with adeno-associated virus vectors." Biochem Biophys Res Commun **388**(4): 711-7.
- Moss, A. R. (1985). "Occupational exposure and brain tumors." J Toxicol Environ Health **16**(5): 703-11.
- Murakami, K., H. Asou, et al. (1999). "Neutral glycolipid and ganglioside composition of type-1 and type-2 astrocytes from rat cerebral hemisphere." J Neurosci Res **55**(3): 382-93.
- Myers, M. P., I. Pass, et al. (1998). "The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13513-8.
- Nakamura, K., Y. Ito, et al. (2004). "Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model." Gene Ther **11**(14): 1155-64.
- Nakamura, M., T. Watanabe, et al. (2001). "p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas." Brain Pathol **11**(2): 159-68.
- Nakamura, M., T. Watanabe, et al. (2001). "Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene." Carcinogenesis **22**(10): 1715-9.
- Neglia, J. P., A. T. Meadows, et al. (1991). "Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood." N Engl J Med **325**(19): 1330-6.
- Nestler, U., H. Wakimoto, et al. (2004). "The combination of adenoviral HSV TK gene therapy and radiation is effective in athymic mouse glioblastoma xenografts without increasing toxic side effects." J Neurooncol **67**(1-2): 177-88.

- Network, C. G. A. R. (2008). "Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways." *Nature* **455**(7216): 1061-8.
- Niranjan, A., D. Wolfe, et al. (2003). "Treatment of rat gliosarcoma brain tumors by HSV-based multigene therapy combined with radiosurgery." *Mol Ther* **8**(4): 530-42.
- Ogretmen, B. and Y. A. Hannun (2004). "Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment." *Nat Rev Cancer* **4**(8): 604-16.
- Ohgaki, H., H. Huang, et al. (2000). "More about: cell and molecular biology of simian virus 40: implications for human infections and disease." *J Natl Cancer Inst* **92**(6): 495-7.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2005). "Epidemiology and etiology of gliomas." *Acta Neuropathol* **109**(1): 93-108.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2005). "Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas." *J Neuropathol Exp Neurol* **64**(6): 479-89.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2007). "Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma." *Am J Pathol* **170**(5): 1445-53.
- Okada, H. and I. F. Pollack (2004). "Cytokine gene therapy for malignant glioma." *Expert Opin Biol Ther* **4**(10): 1609-20.
- Olivier, M., D. E. Goldgar, et al. (2003). "Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype." *Cancer Res* **63**(20): 6643-50.
- Olson, J. J. and T. Ryken (2008). "Guidelines for the treatment of newly diagnosed glioblastoma: introduction." *J Neurooncol* **89**(3): 255-8.
- Palu, G., A. Cavaggioni, et al. (1999). "Gene therapy of glioblastoma multiforme via combined expression of suicide and cytokine genes: a pilot study in humans." *Gene Ther* **6**(3): 330-7.
- Pan, S. Y., A. M. Ugnat, et al. (2005). "Occupational risk factors for brain cancer in Canada." *J Occup Environ Med* **47**(7): 704-17.
- Park, M. A., T. Walker, et al. (2009). "MDA-7/IL-24-induced cell killing in malignant renal carcinoma cells occurs by a ceramide/CD95/PERK-dependent mechanism." *Mol Cancer Ther*.
- Park, M. A., A. Yacoub, et al. (2008). "PERK-dependent regulation of MDA-7/IL-24-induced autophagy in primary human glioma cells." *Autophagy* **4**(4): 513-5.
- Park, M. A., G. Zhang, et al. (2008). "Regulation of autophagy by ceramide-CD95-PERK signaling." *Autophagy* **4**(7): 929-31.
- Parrish-Novak, J., W. Xu, et al. (2002). "Interleukins 19, 20, and 24 signal through two distinct receptor complexes. Differences in receptor-ligand interactions mediate unique biological functions." *J Biol Chem* **277**(49): 47517-23.
- Parsons, D. W., S. Jones, et al. (2008). "An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme." *Science* **321**(5897): 1807-12.
- Pataer, A., W. Hu, et al. (2008). "Adenoviral endoplasmic reticulum-targeted mda-7/interleukin-24 vector enhances human cancer cell killing." *Mol Cancer Ther* **7**(8): 2528-35.
- Pataer, A., S. A. Vorburger, et al. (2002). "Adenoviral transfer of the melanoma differentiation-associated gene 7 (mda7) induces apoptosis of lung cancer cells via up-regulation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)." *Cancer Res* **62**(8): 2239-43.

- Paternot, S., L. Bockstaele, et al. (2010). "Rb inactivation in cell cycle and cancer: the puzzle of highly regulated activating phosphorylation of CDK4 versus constitutively active CDK-activating kinase." Cell Cycle **9**(4): 689-99.
- Paul, C. P., M. Everts, et al. (2008). "Characterization of infectivity of knob-modified adenoviral vectors in glioma." Cancer Biol Ther **7**(5): 786-93.
- Paulus, W., I. Baur, et al. (1995). "Effects of transforming growth factor-beta 1 on collagen synthesis, integrin expression, adhesion and invasion of glioma cells." J Neuropathol Exp Neurol **54**(2): 236-44.
- Peiffer, J. and P. Kleihues (1999). "Hans-Joachim Scherer (1906-1945), pioneer in glioma research." Brain Pathol **9**(2): 241-5.
- Peters, F. M., S. Preston-Martin, et al. (1981). "Brain tumors in children and occupational exposure of parents." Science **213**(4504): 235-7.
- Pfeiffer, B. D., T. T. Ngo, et al. (2010). "Refinement of tools for targeted gene expression in Drosophila." Genetics **186**(2): 735-55.
- Phuong, L. K., C. Allen, et al. (2003). "Use of a vaccine strain of measles virus genetically engineered to produce carcinoembryonic antigen as a novel therapeutic agent against glioblastoma multiforme." Cancer Res **63**(10): 2462-9.
- Ponnazhagan, S., G. Mahendra, et al. (2004). "Adeno-associated virus 2-mediated antiangiogenic cancer gene therapy: long-term efficacy of a vector encoding angiostatin and endostatin over vectors encoding a single factor." Cancer Res **64**(5): 1781-7.
- Preston-Martin, S., W. Mack, et al. (1989). "Risk factors for gliomas and meningiomas in males in Los Angeles County." Cancer Res **49**(21): 6137-43.
- Preston, D. L., E. Ron, et al. (2002). "Tumors of the nervous system and pituitary gland associated with atomic bomb radiation exposure." J Natl Cancer Inst **94**(20): 1555-63.
- Purow, B. W., R. M. Haque, et al. (2005). "Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation." Cancer Res **65**(6): 2353-63.
- Puumalainen, A. M., M. Vapalahti, et al. (1998). "Beta-galactosidase gene transfer to human malignant glioma in vivo using replication-deficient retroviruses and adenoviruses." Hum Gene Ther **9**(12): 1769-74.
- Raff, M. C., E. R. Abney, et al. (1983). "Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides, and growth characteristics." J Neurosci **3**(6): 1289-1300.
- Rainov, N. G. and H. Ren (2003). "Clinical trials with retrovirus mediated gene therapy-- what have we learned?" J Neurooncol **65**(3): 227-36.
- Ramesh, R., I. Ito, et al. (2004). "Ectopic production of MDA-7/IL-24 inhibits invasion and migration of human lung cancer cells." Mol Ther **9**(4): 510-8.
- Ramesh, R., A. M. Mhashikar, et al. (2003). "Melanoma differentiation-associated gene 7/interleukin (IL)-24 is a novel ligand that regulates angiogenesis via the IL-22 receptor." Cancer Res **63**(16): 5105-13.
- Ramplung, R., G. Cruickshank, et al. (2000). "Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma." Gene Ther **7**(10): 859-66.
- Rao, R. D. and C. D. James (2004). "Altered molecular pathways in gliomas: an overview of clinically relevant issues." Semin Oncol **31**(5): 595-604.

- Ries, C., V. Egea, et al. (2007). "MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines." Blood **109**(9): 4055-63.
- Ron, E., B. Modan, et al. (1988). "Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood." N Engl J Med **319**(16): 1033-9.
- Roth, W., S. Isenmann, et al. (1999). "Locoregional Apo2L/TRAIL eradicates intracranial human malignant glioma xenografts in athymic mice in the absence of neurotoxicity." Biochem Biophys Res Commun **265**(2): 479-83.
- Rustamzadeh, E., W. A. Hall, et al. (2007). "Intracranial therapy of glioblastoma with the fusion protein DTAT in immunodeficient mice." Int J Cancer **120**(2): 411-9.
- Saeki, T., A. Mhashilkar, et al. (2000). "Tumor-suppressive effects by adenovirus-mediated mda-7 gene transfer in non-small cell lung cancer cell in vitro." Gene Ther **7**(23): 2051-7.
- Saeki, T., A. Mhashilkar, et al. (2002). "Inhibition of human lung cancer growth following adenovirus-mediated mda-7 gene expression in vivo." Oncogene **21**(29): 4558-66.
- Saito, R., J. R. Bringas, et al. (2004). "Convection-enhanced delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand with systemic administration of temozolomide prolongs survival in an intracranial glioblastoma xenograft model." Cancer Res **64**(19): 6858-62.
- Sandmair, A. M., M. Turunen, et al. (2000). "Herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy in experimental rat BT4C glioma model: effect of the percentage of thymidine kinase-positive glioma cells on treatment effect, survival time, and tissue reactions." Cancer Gene Ther **7**(3): 413-21.
- Sarkar, D., P. Dent, et al. (2008). "Acquired and innate resistance to the cancer-specific apoptosis-inducing cytokine, mda-7/IL-24: not insurmountable therapeutic problems." Cancer Biol Ther **7**(1): 109-12.
- Sarkar, D., I. V. Lebedeva, et al. (2007). "Melanoma differentiation associated gene-7 (mda-7)/IL-24: a 'magic bullet' for cancer therapy?" Expert Opin Biol Ther **7**(5): 577-86.
- Sarkar, D., Z. Z. Su, et al. (2002). "mda-7 (IL-24): signaling and functional roles." Biotechniques Suppl: 30-9.
- Sarkar, D., Z. Z. Su, et al. (2002). "mda-7 (IL-24) Mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 10054-9.
- Sauane, M., R. V. Gopalkrishnan, et al. (2004). "Mechanistic aspects of mda-7/IL-24 cancer cell selectivity analysed via a bacterial fusion protein." Oncogene **23**(46): 7679-90.
- Sauane, M., R. V. Gopalkrishnan, et al. (2003). "MDA-7/IL-24: novel cancer growth suppressing and apoptosis inducing cytokine." Cytokine Growth Factor Rev **14**(1): 35-51.
- Sauane, M., I. V. Lebedeva, et al. (2004). "Melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24 promotes tumor cell-specific apoptosis through both secretory and nonsecretory pathways." Cancer Res **64**(9): 2988-93.
- Sauane, M., Z. Z. Su, et al. (2010). "Ceramide plays a prominent role in MDA-7/IL-24-induced cancer-specific apoptosis." J Cell Physiol **222**(3): 546-55.

- Sauane, M., Z. Z. Su, et al. (2008). "Autocrine regulation of mda-7/IL-24 mediates cancer-specific apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(28): 9763-8.
- Schneider, T. and S. Victor (1993). "The Turcot syndrome (glioma polyposis) and its neurosurgical significance. Case report." *Neurosurg Rev* **16**(4): 327-30.
- Shaw, R. J., J. G. Paez, et al. (2001). "The Nf2 tumor suppressor, merlin, functions in Rac-dependent signaling." *Dev Cell* **1**(1): 63-72.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." *Genes Dev* **13**(12): 1501-12.
- Sherr, C. J. and J. D. Weber (2000). "The ARF/p53 pathway." *Curr Opin Genet Dev* **10**(1): 94-9.
- Silber, J. R., M. S. Bobola, et al. (1998). "O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in adult gliomas: relation to patient and tumor characteristics." *Cancer Res* **58**(5): 1068-73.
- Stott, F. J., S. Bates, et al. (1998). "The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2." *EMBO J* **17**(17): 5001-14.
- Stupp, R., J. C. Tonn, et al. (2010). "High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." *Ann Oncol* **21** Suppl 5: v190-3.
- Su, Z., L. Emdad, et al. (2005). "Unique aspects of mda-7/IL-24 antitumor bystander activity: establishing a role for secretion of MDA-7/IL-24 protein by normal cells." *Oncogene* **24**(51): 7552-66.
- Su, Z., I. V. Lebedeva, et al. (2001). "A combinatorial approach for selectively inducing programmed cell death in human pancreatic cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(18): 10332-7.
- Su, Z. Z., I. V. Lebedeva, et al. (2003). "Melanoma differentiation associated gene-7, mda-7/IL-24, selectively induces growth suppression, apoptosis and radiosensitization in malignant gliomas in a p53-independent manner." *Oncogene* **22**(8): 1164-80.
- Su, Z. Z., M. T. Madireddi, et al. (1998). "The cancer growth suppressor gene mda-7 selectively induces apoptosis in human breast cancer cells and inhibits tumor growth in nude mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(24): 14400-5.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." *Cell* **126**(4): 663-76.
- Tamura, K., M. Tamura, et al. (2001). "Eradication of murine brain tumors by direct inoculation of concentrated high titer-recombinant retrovirus harboring the herpes simplex virus thymidine kinase gene." *Gene Ther* **8**(3): 215-22.
- Tenzen, T., F. Zembowicz, et al. (2009). "Genome modification in human embryonic stem cells." *J Cell Physiol* **222**(2): 278-81.
- Thomas, K. R. and M. R. Capecchi (1987). "Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells." *Cell* **51**(3): 503-12.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *Science* **282**(5391): 1145-7.
- Tondel, M., G. Carlsson, et al. (1996). "Incidence of neoplasms in ages 0-19 y in parts of Sweden with high ¹³⁷Cs fallout after the Chernobyl accident." *Health Phys* **71**(6): 947-50.

- Trizna, Z., M. de Andrade, et al. (1998). "Genetic polymorphisms in glutathione S-transferase mu and theta, N-acetyltransferase, and CYP1A1 and risk of gliomas." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **7**(6): 553-5.
- Tso, C. L., W. A. Freije, et al. (2006). "Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups." Cancer Res **66**(1): 159-67.
- Uzzaman, M., R. J. Benveniste, et al. (2005). "Embryonic stem cell-derived astrocytes: a novel gene therapy vector for brain tumors." Neurosurg Focus **19**(3): E6.
- Van Meir, E. G., C. G. Hadjipanayis, et al. (2010). "Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma." CA Cancer J Clin **60**(3): 166-93.
- Verhaak, R. G., K. A. Hoadley, et al. (2010). "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1." Cancer Cell **17**(1): 98-110.
- Vilchez, R. A., C. A. Kozinetz, et al. (2003). "Simian virus 40 in human cancers." Am J Med **114**(8): 675-84.
- Voges, J., R. Reszka, et al. (2003). "Imaging-guided convection-enhanced delivery and gene therapy of glioblastoma." Ann Neurol **54**(4): 479-87.
- Wakitani, S., K. Takaoka, et al. (2003). "Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint." Rheumatology (Oxford) **42**(1): 162-5.
- Wang, M., Z. Tan, et al. (2002). "Interleukin 24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2." J Biol Chem **277**(9): 7341-7.
- Wang, W. J., C. K. Tai, et al. (2003). "Highly efficient and tumor-restricted gene transfer to malignant gliomas by replication-competent retroviral vectors." Hum Gene Ther **14**(2): 117-27.
- Wei, J., J. Wahl, et al. (2007). "Targeted release of oncolytic measles virus by blood outgrowth endothelial cells in situ inhibits orthotopic gliomas." Gene Ther **14**(22): 1573-86.
- Willenbring, H. and M. Grompe (2003). "Embryonic versus adult stem cell pluripotency: in liver only fusion matters." J Assist Reprod Genet **20**(10): 393-4.
- Woodworth, G., M. J. McGirt, et al. (2005). "Accuracy of frameless and frame-based image-guided stereotactic brain biopsy in the diagnosis of glioma: comparison of biopsy and open resection specimen." Neurol Res **27**(4): 358-62.
- Wrensch, M., M. Yost, et al. (1999). "Adult glioma in relation to residential power frequency electromagnetic field exposures in the San Francisco Bay area." Epidemiology **10**(5): 523-7.
- Yacoub, A., P. Gupta, et al. (2008). "Regulation of GST-MDA-7 toxicity in human glioblastoma cells by ERBB1, ERK1/2, PI3K, and JNK1-3 pathway signaling." Mol Cancer Ther **7**(2): 314-29.
- Yacoub, A., H. Hamed, et al. (2008). "MDA-7/IL-24 plus radiation enhance survival in animals with intracranial primary human GBM tumors." Cancer Biol Ther **7**(6): 917-33.
- Yacoub, A., H. A. Hamed, et al. (2010). "PERK-dependent regulation of ceramide synthase 6 and thioredoxin play a key role in mda-7/IL-24-induced killing of primary human glioblastoma multiforme cells." Cancer Res **70**(3): 1120-9.

- Yacoub, A., C. Mitchell, et al. (2003). "MDA-7 (interleukin-24) inhibits the proliferation of renal carcinoma cells and interacts with free radicals to promote cell death and loss of reproductive capacity." Mol Cancer Ther **2**(7): 623-32.
- Yacoub, A., C. Mitchell, et al. (2004). "MDA-7 regulates cell growth and radiosensitivity in vitro of primary (non-established) human glioma cells." Cancer Biol Ther **3**(8): 739-51.
- Yacoub, A., C. Mitchell, et al. (2003). "mda-7 (IL-24) Inhibits growth and enhances radiosensitivity of glioma cells in vitro via JNK signaling." Cancer Biol Ther **2**(4): 347-53.
- Yacoub, A., C. Mitchell, et al. (2003). "Melanoma differentiation-associated 7 (interleukin 24) inhibits growth and enhances radiosensitivity of glioma cells in vitro and in vivo." Clin Cancer Res **9**(9): 3272-81.
- Yacoub, A., M. A. Park, et al. (2008). "Caspase-, cathepsin-, and PERK-dependent regulation of MDA-7/IL-24-induced cell killing in primary human glioma cells." Mol Cancer Ther **7**(2): 297-313.
- Yamaguchi, N., B. Anand-Apte, et al. (1999). "Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding." EMBO J **18**(16): 4414-23.
- Yamaguchi, T., T. Okada, et al. (2003). "Enhancement of thymidine kinase-mediated killing of malignant glioma by BimS, a BH3-only cell death activator." Gene Ther **10**(5): 375-85.
- Yang, H., M. Chopp, et al. (2007). "Using behavioral measurement to assess tumor progression and functional outcome after antiangiogenic treatment in mouse glioma models." Behav Brain Res **182**(1): 42-50.
- Yano, H., A. Hara, et al. (2000). "Differential expression of beta-catenin in human glioblastoma multiforme and normal brain tissue." Neurol Res **22**(7): 650-6.
- Yu, J., M. A. Vodyanik, et al. (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." Science **318**(5858): 1917-20.
- Zaidi, H. A., T. Kosztowski, et al. (2009). "Origins and clinical implications of the brain tumor stem cell hypothesis." J Neurooncol **93**(1): 49-60.
- Zarnescu, O., F. M. Brehar, et al. (2008). "Immunohistochemical localization of caspase-3, caspase-9 and Bax in U87 glioblastoma xenografts." J Mol Histo **39**(6): 561-9.
- Zarnitsyn, V. G., P. P. Kamaev, et al. (2007). "Ultrasound-enhanced chemotherapy and gene delivery for glioma cells." Technol Cancer Res Treat **6**(5): 433-42.
- Zhang, J., I. Frolov, et al. (2004). "Gene therapy for malignant glioma using Sindbis vectors expressing a fusogenic membrane glycoprotein." J Gene Med **6**(10): 1082-91.
- Zheng, T., K. P. Cantor, et al. (2001). "Occupational risk factors for brain cancer: a population-based case-control study in Iowa." J Occup Environ Med **43**(4): 317-24.
- Zhu, Y., T. Harada, et al. (2005). "Inactivation of NF1 in CNS causes increased glial progenitor proliferation and optic glioma formation." Development **132**(24): 5577-88.
- Zhu, Z., T. Zheng, et al. (2002). "Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling." Semin Cell Dev Biol **13**(2): 121-8.

- Zou, J., M. L. Maeder, et al. (2009). "Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells." Cell Stem Cell **5**(1): 97-110.
- Zwaka, T. P. and J. A. Thomson (2003). "Homologous recombination in human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **21**(3): 319-21.

RINGRAZIAMENTI

Alla Professoressa Isabelle Germano, per avermi accolto nel Suo laboratorio e per avermi onorato di far parte della Suo gruppo di ricerca. La dedizione professionale, l'onestà, la generosità e la creatività che La contraddistinguono saranno sempre delle inesauribili fonti di ispirazione.

Al gruppo di ricerca del laboratorio di terapia genica neuro-oncologica del Dipartimento di Neurochirurgia del Mount Sinai Medical Center di New York, in particolare:

alla Dott.ssa Luni Emdad, la sua disponibilità ed umanità sono merce tanto rara tra i ricercatori da rendere scontate le sue straordinarie doti scientifiche;

alla Dott.ssa Emanuela Binello, per gli stimoli scientifici, la disponibilità al confronto e la tenacia non comune che mi saranno sempre di esempio;

a Zulekha Qadeer, per i preziosi insegnamenti, gli indispensabili suggerimenti, il fondamentale supporto in laboratorio e per la sua amicizia;

ad Harini Kothari, per la preziosa collaborazione in laboratorio.

Alla Dottoressa Grazia Fenu, con cui ho condiviso in modo intenso questi tre anni di Scuola di Dottorato. È stata una guida, un confronto, una infaticabile fonte di suggerimenti. Nella Sua disponibilità non ha mai tenuto conto di festività o di orari lavorativi, ha sempre stimolato la progressione delle attività di ricerca con spunti scientifici sempre nuovi e con una esemplare capacità organizzativa, nonostante i mezzi non sempre ideali a disposizione. Sono le donne e gli uomini come Lei che, lavorando senza clamore e spinti da disinteressata curiosità scientifica, rendono onore alla Scienza e permettono il progresso dell'Umanità.